

**Die Rolle von Sirt4 im myokardialen
Ischämie-Reperfusions-Schaden**

von Stefanie Sohn

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Die Rolle von Sirt4 im myokardialen
Ischämie-Reperfusionsschaden**

von Stefanie Sohn

aus Essen

München 2018

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Prof. Dr. Gerhard Wess

Angefertigt im: Universitäts-Herzzentrum Freiburg – Bad Krozingen,
Abteilung Kardiologie und Angiologie I, Universitätsklinikum Freiburg

Mentor: Priv.-Doz. Dr. Heiko Bugger

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D

Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Wess

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Tag der Promotion: 10. Februar 2018

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Kardialer Energiesubstratstoffwechsel	3
2.	Mitochondriale Atmungskette	5
3.	Regulation des mitochondrialen Stoffwechsels im Herzen.....	7
4.	Sirtuine	9
5.	Sirtuin 4.....	11
6.	Myokardialer Ischämie-Reperfusionsschaden	12
7.	Hypothese.....	16
III.	MATERIAL UND METHODEN	17
1.	Material	17
1.1.	Geräte	17
1.2.	Verbrauchsmaterialien	20
1.3.	Chemikalien	22
1.4.	Oligonukleotide	23
1.5.	Versuchstiere	24
2.	Methoden.....	25
2.1.	Genotypisierung	25
2.1.1.	Lyse und DNA-Extraktion	25
2.1.2.	Konventionelle PCR.....	26
2.1.3.	Agarose-Gelelektrophorese	28
2.2.	Herzgewicht/Körpergewicht und Tibia/Körpergewicht-Verhältnis.....	29
2.3.	Herstellung von Homogenaten.....	29
2.4.	SDS-Page und Western Blot	30
2.5.	Mitochondrienisolation	32
2.6.	Bestimmung des Proteingehaltes (BCA-Reaktion).....	33
2.7.	Polarographische Atmungsmessung	34

2.8.	LAD-Ligatur.....	35
2.9.	Bestimmung der Infarktgröße mittels Evans Blue-TTC-Staining	37
2.10.	Langendorff-Perfusion	39
2.10.1.	Aufbau Perfusionssystem.....	39
2.10.2.	Perfusionspuffer	41
2.10.3.	Allgemeiner Versuchsablauf.....	41
2.10.4.	Messung kontraktile Parameter.....	42
2.10.5.	Ischämie/Reperfusion.....	42
2.11.	„Swelling Assay“	43
2.12.	Amplex Red Assay.....	44
2.13.	Statistik.....	45
IV.	ERGEBNISSE	46
1.	Validierung der Tiermodelle.....	46
2.	Untersuchungen in Sirt4^{-/-} Mäusen	48
2.1.	Herzgewicht, Körpergewicht und Tibialänge in Sirt4 ^{-/-} Mäusen	48
2.2.	Kontraktile Funktion in Sirt4 ^{-/-} Mäusen	49
2.3.	Myokardiale mitochondriale Atmungskapazität in Sirt4 ^{-/-} Mäusen	50
2.4.	Kardiale Infarktgröße nach LAD-Ligatur in Sirt4 ^{-/-} Mäusen	51
2.5.	Post-ischämische Erholung der Herzfunktion in Sirt4 ^{-/-} Mäusen.....	51
2.6.	Kardiale mPTP-Öffnung in Sirt4 ^{-/-} Mäusen	54
2.7.	Kardiale mitochondriale H ₂ O ₂ -Bildung in Sirt4 ^{-/-} Mäusen	55
3.	Untersuchungen in cSirt4TG Mäusen.....	56
3.1.	Herzgewicht, Körpergewicht und Tibialänge in cSirt4TG Mäusen	56
3.2.	Kontraktile Funktion in cSirt4TG Mäusen.....	56
3.3.	Kardiale Infarktgröße nach LAD-Ligatur in cSirt4TG Mäusen.....	58
3.4.	Post-ischämische Erholung der Herzfunktion in cSirt4TG Mäusen	58
V.	DISKUSSION	61
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	68
VII.	SUMMARY.....	69
VIII.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	70
IX.	TABELLENVERZEICHNIS	72

X.	LITERATURVERZEICHNIS	74
XI.	DANKSAGUNG	88

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
AAR	Area at Risk
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
AceCS2	Acetyl-CoA Synthetase 2
ADP	Adenosindiphosphat
α -MHC	alpha myosin-heavy chain
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ANT	Adenin-Nukleotid-Transporter
ATP	Adenosintriphosphat
AKT	Proteinkinase B
BCA	Bicinchoninsäure
bpm	beats per minute
bps	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Celsius
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CaCl ₂	Calciumchlorid
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
CPT	Carnitine-Palmitoyl-Transferase
cre	cyclization recombination
cSirt4TG	cardiomyocyte-specific Sirt4 transgen
CX	Arteria circumflexa
Cyp D	Cyclophilin D
Cyt C	Cytochrom C
ddH ₂ O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dP/dt_{\max}	maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit
dP/dt_{\min}	minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERR α	Estrogen-related Receptor α
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH ₂	reduzierte Form von FAD
FAT	Fatty-Acid-Translokase
FATP	Fatty-Acid-Transport-Protein
FOXO	Forkhead transcription factor subclass 0
G	Gauge
g	Gramm
g	mittlere Erdbeschleunigung
GDH	Glutamatdehydrogenase
GLUT 1 + 4	Glukose Transporter 1 + 4
h	Stunde
H ⁺	Proton
H ₂	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H3 + H4	Histon 3 + 4
HCl	Salzsäure
HEPES	Ethansulfonsäure
HF	Herzfrequenz
HG	Herzgewicht
HRP	Horseradish Peroxidase
i.p.	intraperitoneal
I/R	Ischämie/Reperfusion
IDH2	Isocitrat-Dehydrogenase 2
JAK/STAT3	Januskinase/Signal Transducers and Activators of Transcription
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton

kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	Knockout
l	Liter
LAD	left anterior descending artery
LCAD	Langketten-Acyl-CoA-Dehydrogenase
LM	left main coronary artery
LVDP	left ventricular developed pressure
LVP	left ventricular pressure
m	Steigungsquotient
MCAD	Mittelketten-Acyl-CoA-Dehydrogenase
MCD	Malonyl-CoA Decarboxylase
MPC	mitochondrialer Pyruvat-Carrier
MEK/ERK	Mitogen-activated protein kinase/ extracellular signal-regulated kinases
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mm	Millimeter
mmol	Millimol
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
Mm.	Musculi
MnSOD	Mangan Superoxiddismutase
MnTBAP	Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTP-131	Elamipretide
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium

NaCl	Kochsalz
NAD ⁺	oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMN	Nikotinamidmononukleotid
nmol	Nanomol
NRF 1 + 2	Nuclear Respiratory Factor 1 + 2
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{·-}	Superoxid-Radikal
ONOO ₂ ^{·-}	Peroxynitrit
p	Signifikanzwert
p53	Tumorsuppressorgen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PEEP	positive end-expiratory pressure
PFK	Phosphofruktokinase
PGC1 α	Transkriptionscoaktivator PPAR γ Coactivator 1 α
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pmol	Pikomol
PPAR α	Peroxisome Proliferator-activated Receptor α
RCA	right coronary artery
RISK-Signalweg	Reperfusion Injury Salvage Kinase Signalweg
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RXR α	Retinoid X Rezeptor α
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
s.c.	subkutan
SAFE-Signalweg	Survivor Activating Factor Enhancement
SDS-Page	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SIR2	silent information regulator

siRNA	small interfering RNA
Sirt	Sirtuin
Sirt4 ^{-/-}	Sirt4 Knockout
Sirt4 ^{+/+}	Sirt4 Wildtyp
SOD2	Superoxid-Dismutase
SS-31	Bendavia
STE1 + 2	Sodium Chloride-Tris-EDTA-Puffer
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus-Polymerase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFAm	Mitochondrial Transcription Factor A
TL	Tibiallänge
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TPP	Tetraphenylphosphonium
Tris	Tris-Aminomethan
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
U	Unit
UQ	Ubichinon
UV	Ultraviolett
V	Volt
V.	Vena
VDAC	voltage-dependent anion channel
w/v	weight per volume
WT	Wildtyp

I. EINLEITUNG

Der akute Myokardinfarkt ist jedes Jahr für den Tod von Millionen Menschen weltweit verantwortlich und ist die Hauptursache der chronischen Herzinsuffizienz. Hierbei ist die Prognose nach einem Herzinfarkt hauptsächlich von der kardialen Infarktgröße abhängig (Katz 2000; Keeley et al. 2003). Diese wird einerseits durch die Ischämie selbst und andererseits durch die Reperfusion des ischämischen Myokards bestimmt, was zusammenfassend als Ischämie-Reperfusion (I/R) -Schaden bezeichnet wird (Murphy und Steenbergen 2008; Powers et al. 2007). Eine der Hauptursachen des myokardialen Ischämie-Reperfusion-Schadens sind mitochondriale Funktionsstörungen, insbesondere eine beeinträchtigte Regeneration von Adenosintri-phosphat (ATP) (Hausenloy und Yellon 2013), eine Überproduktion von reaktiven O₂-Radikalen (ROS) (Zweier und Talukder 2006) und die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) (Crompton et al. 1999; Di Lisa et al. 2011). Die mPTP ist eine Pore in der inneren Mitochondrienmembran, deren Öffnung zum Untergang des Mitochondriums führen kann (Crompton et al. 1999). Die regulatorischen Mechanismen, die die Mitochondrienfunktion in der kardialen Ischämie-Reperfusion beeinträchtigen, sind bislang unvollständig aufgeklärt.

Sirtuin 4 (Sirt4) ist ein NAD⁺ (oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid)-abhängiges mitochondriales Enzym, welches als ADP (Adenosindiphosphat)-Ribosyltransferase (Ahuja et al. 2007), Deacetylase (Laurent et al. 2013; Rauh et al. 2013) und Lipoamidase (Mathias et al. 2014) fungiert. Es ist bislang wenig charakterisiert, und seine Funktion im Herzen ist trotz deutlicher kardialer Expressionsspiegel nahezu unbekannt. Ein Target von Sirt4 ist Cyclophilin D, welches eine vermehrte Öffnung der mPTP bewirkt (Alam et al. 2015). Überexpression von Sirt4 kann die mPTP-Öffnung begünstigen, wohingegen Fehlen von Sirt4 die Öffnung der mPTP verhindern kann (Verma et al. 2013). Da es während der I/R zu einem Verlust an mitochondrialem NAD⁺ kommt, wurde die Vermutung geäußert, dass die Aktivität mitochondrialer Sirtuine reduziert sein könnte, was auch Sirt4 mit einschließen würde. Wir haben daher die Hypothese aufgestellt, dass eine Hemmung der Sirt4-Aktivität während der Ischämie-Reperfusion aufgrund einer NAD⁺-Depletion durch Verhinderung der mPTP-Öffnung der Größenzunahme eines Herzinfarktes entgegenwirken könnte. Es war

daraufhin das Ziel dieses Projektes, die Rolle von Sirt4 in der Ausbildung des kardialen Ischämie-Reperfusionsschadens zu untersuchen. Im nächsten Abschnitt soll zur Einführung zunächst ein Überblick über die bekannte Literatur zum kardialen Energiestoffwechsel, im speziellen zum mitochondrialen Stoffwechsel des Herzens, sowie dessen Veränderung bei Ischämie-Reperfusion hergestellt werden. Schließlich sollen die bisher bekannten Funktionen von Sirtuinen, im Besonderen von Sirt4, besprochen werden, um dann in Relation zum kardialen Stoffwechsel die Hypothese dieser Arbeit zu formulieren.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Kardialer Energiesubstratstoffwechsel

Der Energiestoffwechsel ist für das Herz von besonderer Relevanz, da für den Erhalt der kardialen Pumpfunktion kontinuierlich Adenosintriphosphat (ATP) benötigt wird. Diese großen Mengen von ATP werden hauptsächlich durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien gebildet. Normalerweise sind ATP-verbrauchende Reaktionen, wie die Kontraktion oder Strukturhaltung, und ATP-synthetisierende Reaktionen im Gleichgewicht. Das Herz verbrennt als Substrate im Wesentlichen etwa 50-60% freie Fettsäuren und 30-40% Glukose. Zu lediglich geringen Anteilen werden auch Laktat, Aminosäuren und Ketonkörper für die ATP-Synthese oxidiert. Die prozentualen Anteile der einzelnen Substrate an den Oxidationsraten hängen jedoch sehr von ihrer Blutkonzentration ab und können stark variieren. Aufgrund seiner hohen Variabilität an oxidativen Substraten wird das Herz auch als „Allesfresser“ bezeichnet, anders als beispielsweise das Gehirn, welches fast ausschließlich Glukose verstoffwechselt. 80% des vom Herzen verbrauchten ATPs wird für die Kontraktion und Relaxation verbraucht, 15-20% für strukturerhaltende Prozesse und nur 0,5-1% für die Aufrechterhaltung der elektrischen Erregbarkeit (Schmidt et al. 2011; Bauer et al. 2001).

Glukose wird über den Glukose-Transporter-I und IV (Glut1, Glut4) in die Herzmuskelzelle eingeschleust. Dort wird die Glukose im Zytoplasma in der Glykolyse schrittweise abgebaut. Im Rahmen der Glykolyse wird Glukose zu Pyruvat umgewandelt, wobei bereits ATP entsteht. Das Pyruvat wird dann über den mitochondrialen Pyruvat-Carrier (MPC) in das Mitochondrium transportiert, dort durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDH) decarboxyliert und dann die Acetylgruppe auf Coenzym A (CoA) übertragen, so dass Acetyl-CoA entsteht. Fettsäuren werden durch die Transporter Fatty-Acid-Translokase (FAT) und Fatty-Acid-Transport-Protein (FATP) in die Zelle gebracht. Dort werden sie im Zytoplasma durch die Acyl-CoA-Synthetase zu Acyl-CoA aktiviert und anschließend über das Carnithin-Palmitoyl-Transferase (CPT)-Enzymsystem ins Mitochondrium transportiert. Das intramitochondriale Acyl-CoA wird in die Beta-

Oxidation eingeschleust und ebenfalls zu Acetyl-CoA umgewandelt. Das auf beiden Stoffwechselwegen entstandene Acetyl-CoA wird dann in den Citratzyklus eingespeist. Im Citratzyklus fallen reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH_2) als Reduktionsäquivalente an. NADH und FADH_2 liefern anschließend Elektronen an die mitochondriale Atmungskette, wo sie auf Sauerstoff übertragen werden. Dieser Prozess setzt Energie frei, was die Bildung von ATP aus Adenosindiphosphat (ADP) ermöglicht (Schmidt et al. 2011; Stanley et al. 2005). Die beschriebenen Stoffwechselwege von Glucose und Fettsäuren werden in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Die Abläufe der mitochondrialen Atmungskette werden in Kapitel II.2. näher erläutert.

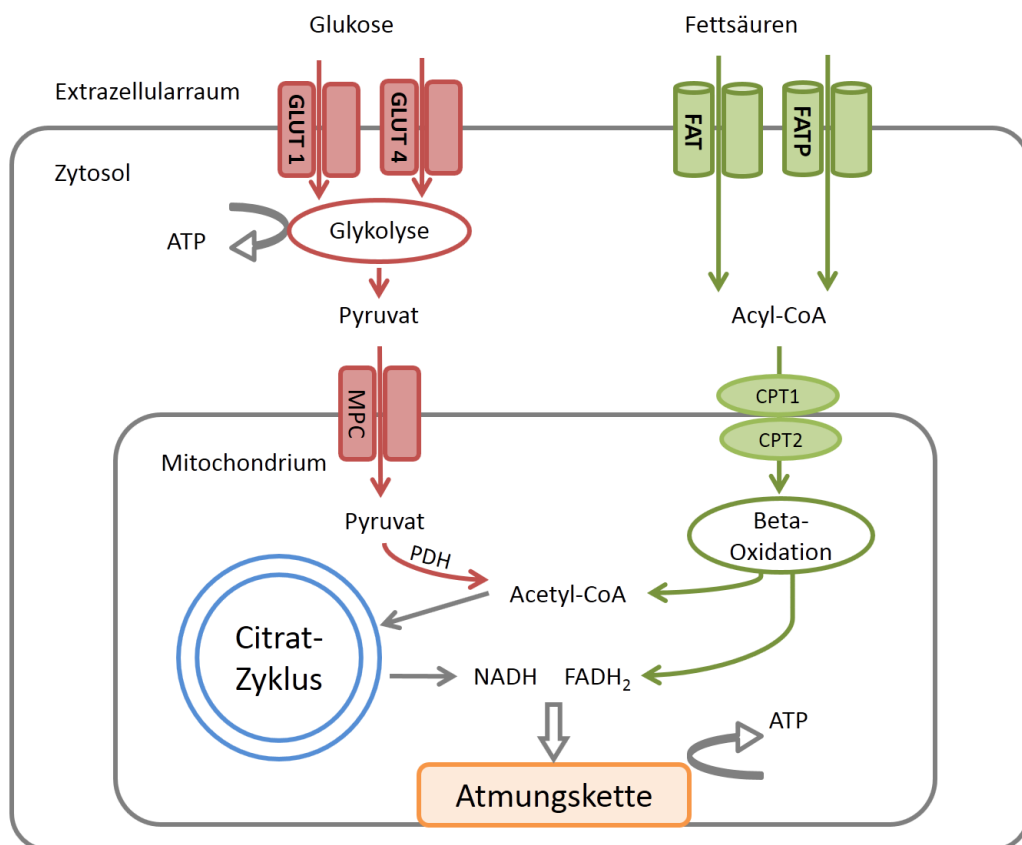


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Energiestoffwechsels im Herzen. Glukose-Transporter (GLUT), Fatty-Acid-Translokase (FAT), Fatty-Acid-Transport-Protein (FATP), Adenosintriphosphat (ATP), Coenzym A (CoA), mitochondrialer Pyruvat-Carrier (MPC), Carnithin-Palmitoyl-Transferase (CPT), Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDH), Nicotinamidadenindinukleotid (NADH), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH_2).

Bei Sauerstoffmangel stellt sich der Herzstoffwechsel um, die oxidative Phosphorylierung wird gehemmt, es kommt zum Absinken des ATP-Spiegels und zur Akkumulation von NADH im Zytoplasma. Aufgrund des O₂-Mangels kann das in der Glykolyse entstehende Pyruvat nicht oxidativ abgebaut werden, so dass die Glykolyse "anaerob" abläuft. Folglich dreht sich die Richtung der von der Lactatdehydrogenase katalysierten Reaktion um und Pyruvat wird zu Lactat abgebaut. Dadurch nimmt der pH-Wert ab und eine Gewebeazidose entsteht (Bauer et al. 2001; Stanley et al. 2005). Die in der anaeroben Glykolyse regenerierten ATP-Mengen reichen nur kurzfristig zum Erhalt der Zellfunktion aus, in der Folge kommt es dann zunehmend zum Untergang von Kardiomyozyten.

2. Mitochondriale Atmungskette

Die Mitochondrien werden häufig als „Kraftwerke“ der Zelle bezeichnet, weil sie das energiereiche Molekül ATP bilden. Da eine kontinuierliche Bereitstellung von ATP besonders im Herzen sehr wichtig ist, ist der Mitochondrienanteil in den Myokardzellen mit bis zu 36% des Gesamtvolumens sehr hoch (Bauer et al. 2001). Die Herstellung von ATP geschieht hauptsächlich über die oxidative Phosphorylierung. In diesem Kapitel soll die mitochondriale Atmungskette näher beschrieben werden.

Die Atmungskette ist an der Innenseite der Mitochondrien lokalisiert und besteht aus 4 Komplexen (Komplex I-IV), welche verschiedene spezifische Aufgaben ausführen. Weiterhin spielen die beiden Moleküle Ubichinon (UQ) und Cytochrom C (Cyt C) als Elektronenüberträger eine wichtige Rolle. Zuerst wird NADH durch den Komplex I (NADH-Dehydrogenase) oxidiert und der Wasserstoff auf Ubichinon übertragen. Der Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) katalysiert die Reaktion Succinat zu Fumarat und reduziert dabei FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) zu FADH₂. Die Elektronen von diesem FADH₂ werden direkt in die Atmungskette eingeschleust. Die Elektronen des FADH₂ werden auf Ubichinon übertragen und Ubichinon wird somit zu Ubichinol reduziert. Das durch die Beta-Oxidation der Fettsäuren entstehende FADH₂ wird durch die Acyl-CoA-Dehydrogenase von Acyl-CoA über FAD ebenfalls auf

Ubichinon übertragen und kann so in die Atmungskette transportiert werden. Durch den Komplex III (Cytochrom C-Reduktase) wird das Ubichinol wieder zu Ubichinon regeneriert, indem die Elektronen auf Cytochrom C übertragen werden. Anschließend kann durch den Komplex IV (Cytochrom C-Oxidase) das mit Elektronen beladene Cytochrom C wieder oxidiert werden. Hierzu werden 2 Elektronen auf ein halbes Sauerstoff-Molekül übertragen, es entsteht H_2O (Wasser). Diese Reaktion wird auch als Knallgasreaktion bezeichnet, da es sich hierbei um den stärksten exergonen Vorgang in der Atmungskette handelt. Pro oxidiertem NADH können 10 Protonen und pro oxidiertem FADH_2 können 6 Protonen (da Komplex I übersprungen wird) von der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum transportiert werden. Durch den entstehenden elektrochemischen Gradienten und den Fluss der Protonen entlang diesem Gradienten zurück in die Mitochondrienmatrix wird die ATP-Synthase angetrieben, welche aus ADP ATP regeneriert (Kreutzig 2001). Dieser Prozess ist in Abbildung 2 vereinfacht dargestellt.

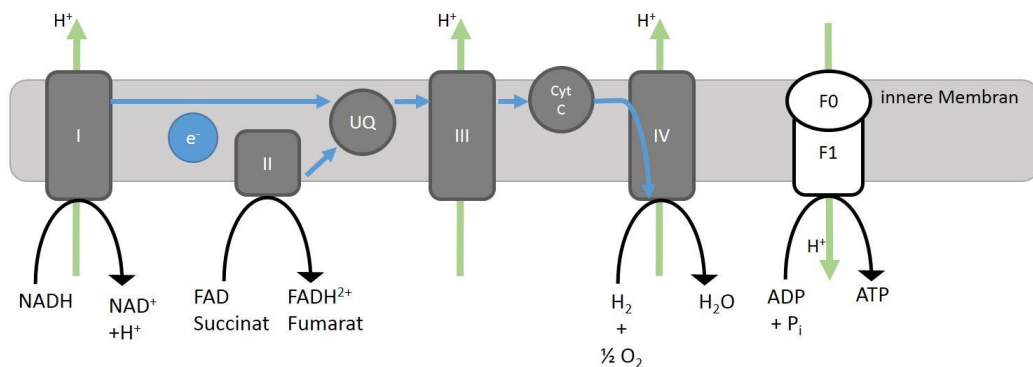


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der Atmungskette. In der mitochondrialen Atmungskette findet an verschiedenen Proteinkomplexen (I-IV) mit Hilfe der Elektronencarrier Ubichinon (UQ) und Cytochrom C (Cyt C) über eine Elektronentransportkette (blaue Pfeile) eine stufenweise Oxidation von H_2 zu H_2O statt. Hierbei werden Protonen (H^+) in den Intermembranraum gepumpt (grüne Pfeile), wodurch ein elektrochemischer Gradient entsteht. Die F_0/F_1 -ATPase nutzt diesen Gradienten zur Phosphorylierung von ADP zu ATP.

Im Normalfall werden immer 4 Elektronen auf ein O_2 -Molekül übertragen. Kommt es jedoch zu einer unzureichenden Reduktion von Sauerstoff, können Elektronen „entweichen“ und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bilden. Etwa 0,2-2% des verbrauchten Sauerstoffs werden in Sauerstoff-Radikale umgewandelt (Madamanchi und Runge 2007). Am häufigsten gebildet und besonders gefährlich ist das kurzlebige Superoxid-Radikal (O_2^-). Die mitochondriale

Superoxiddismutase (SOD2) reduziert Superoxid zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches stabiler ist und anschließend von der Catalase zu H_2O entschärft werden kann. Wenn die reaktiven Sauerstoffradikale nicht entschärft werden, können sie DNA (Desoxyribonukleinsäure), mRNA (Messenger Ribonukleinsäure), Lipide und Proteine oxidieren und so direkt schädigen, oder diese in andere hochreaktive Substanzen umwandeln (z.B. Lipidperoxide wie Malondialdehyd). Außerdem kann es zu Radikal-Radikal-Reaktionen kommen, z.B. mit Stickstoffmonoxid, wobei das hochreaktive Peroxynitrit (ONOO_2^-) gebildet wird (Madamanchi und Runge 2007).

3. Regulation des mitochondrialen Stoffwechsels im Herzen

Das Herz besitzt verschiedene Mechanismen, um sich metabolisch anzupassen und so auf ein verändertes Substratangebot oder veränderte Energieanforderungen reagieren zu können. Wenn die Zelle vermehrt ATP verbraucht, steigen der ADP und der Adenosinmonophosphat (AMP)-Gehalt an. Um mehr ATP generieren zu können, werden in der Adenylat-Kinase-Reaktion aus 2 ADP jeweils 1 Molekül ATP und AMP gebildet. Da AMP in hundertfach niedrigerer Konzentration in der Zelle vorliegt, kommt es somit zu einem schnellen Anstieg des AMP/ATP-Verhältnisses. Dieser Anstieg wird von der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) registriert, welche als zellulärer Sensor fungiert und dessen Aktivität vom AMP/ATP-Verhältnis abhängt (Corton et al. 1994). AMPK wird einerseits durch das Binden von AMP aktiviert und andererseits durch vorgeschaltete Kinasen zusätzlich phosphoryliert und aktiviert (Wong et al. 2009). Nun aktiviert AMPK katabole und hemmt anabole Stoffwechselwege. Hierbei wird vermehrt GLUT4 in die Zellmembran transloziert, so dass eine vermehrte Aufnahme von Glukose erfolgen kann (Young et al. 1999). Zusätzlich steigert AMPK die Rate der Glykolyse, indem es das Schrittmacherenzym der Glykolyse, die Phosphofruktokinase (PFK), aktiviert (Stanley et al. 2005). Außerdem beeinflusst AMPK die Oxidation von Fettsäuren positiv, indem es die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) hemmt und somit die Bildung von Malonyl-CoA aus Acetyl-CoA verhindert. Dadurch wird die Carnitine-Palmitoyltransferase 1 (CPT1) enthemmt und es kommt zu einem vermehrten Transport von Acyl-CoAs in die Mitochondrien.

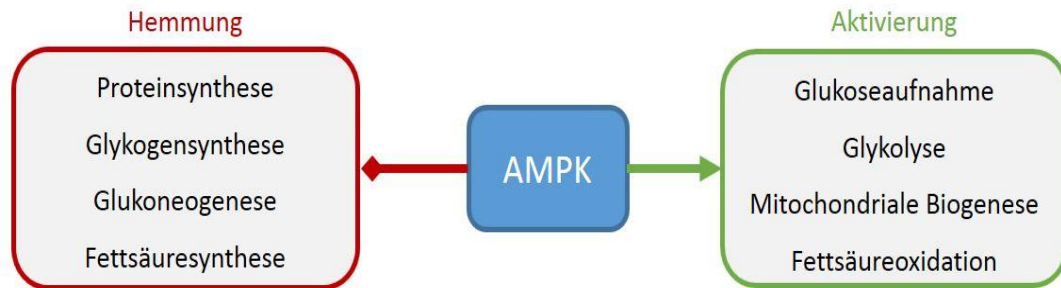


Abbildung 3: Einfluss von AMPK auf den Energiestoffwechsel. AMPK (Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase) aktiviert katabole Stoffwechselwege und hemmt anabole Stoffwechselwege.

Der Fettsäurestoffwechsel wird auch auf transkriptionaler Ebene reguliert. Hier spielt der Transkriptionsfaktor Peroxisome Proliferator-activated Receptor α (PPAR α) eine wichtige Rolle. Binden im Herzen langkettige Fettsäuren an PPAR α , wird er aktiviert und formt Heterodimere mit dem Retinoid X Rezeptor α (RXR α) (Berger und Moller 2002). Dieser Komplex bindet nun an PPAR α Erkennungssequenzen innerhalb der Promotoren nahezu aller Gene, die für Enzyme und Proteine der Fettsäureaufnahme und -oxidation kodieren, wie etwa die Mittelketten Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD), die Langketten Acyl-CoA Dehydrogenase (LCAD) und FAT. Diese werden daraufhin vermehrt exprimiert und bewirken eine erhöhte Rate der Fettsäureaufnahme und -oxidation in den Kardiomyozyten (Gilde et al. 2003; Huss und Kelly 2004). Umgekehrt konnte nachgewiesen werden, dass in PPAR α -Knockout-Mäusen eine niedrigere Expression von Enzymen für die Fettsäureoxidation vorlag und dass die Rate der Fettsäureoxidation geringer war (Campbell et al. 2002).

Außerdem kann die Wirkung von PPAR α auf die Genexpression durch die Bindung des Transkriptionscoaktivators PPAR γ Coactivator 1 α (PGC1 α) an PPAR α verstärkt werden (Vega et al. 2000). Zusätzlich coaktiviert PGC1 α die Transkriptionsfaktoren Nuclear Respiratory Factor 1 (NRF1) und 2 (NRF2), und Estrogen-related Receptor α (ERR α) und steigert so die Transkription von Untereinheiten der Atmungskette. Des Weiteren erhöht PGC1 α die Expression des Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM), welcher die Replikation mitochondrialer DNA und die Transkription mitochondrial kodierter Atmungskettenuntereinheiten fördert. Somit bewirkt eine vermehrte Expression von PGC1 α eine höhere Expression von Atmungskettenproteinen und eine Zunahme der mitochondrialen Biogenese (Lehman et al. 2000).

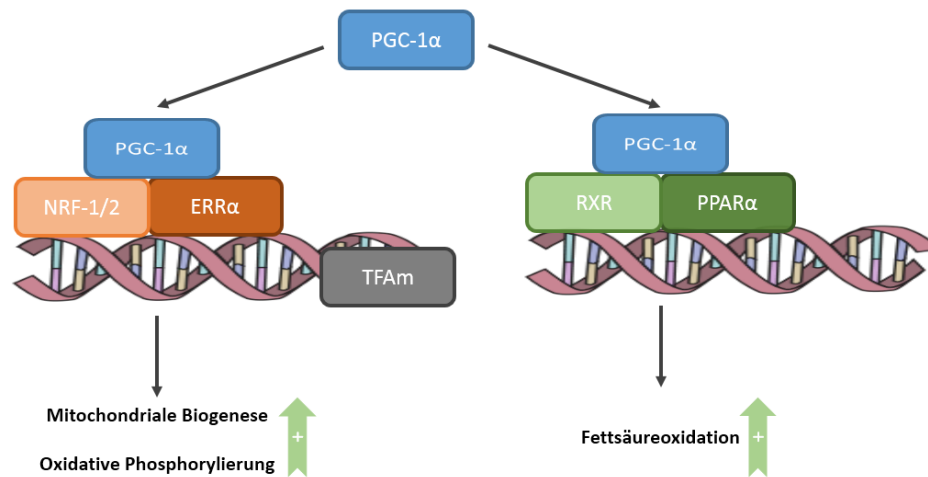


Abbildung 4: Schematische Darstellung von PGC-1 α und seinen Interaktionspartnern. Über NRF-1/2 (Nuclear Respiratory Factor-1/2) und ERR α (Estrogen-related Receptor α) werden die mitochondriale Biogenese, sowie die oxidative Phosphorylierung gesteigert. Außerdem fördert PGC-1 α (Transkriptionscoaktivator PPAR γ Coactivator 1 α) über die Coaktivierung von PPAR α (Peroxisome Proliferator-activated Receptor α) und RXR α (Retinoid X Rezeptor α) die Transkription von Genen der Fettsäureoxidation.

4. Sirtuine

Lysinacetylierung und ADP-Ribosylierung sind hoch konservierte Mechanismen der posttranslationalen Modifizierung von Proteinen (Zhang et al. 2009). So ist eine Dysregulation der Lysinacetylierung von Proteinen mit einem beschleunigten Alterungsprozess, unterschiedlichen Krebserkrankungen, sowie neurodegenerativen und kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert (Haigis und Guarente 2006; Hake et al. 2004; McKinsey und Olson 2004). In Vertebraten wird die Proteinacetylierung wesentlich durch die NAD⁺-abhängigen Enzyme der Sirtuin (Sirt)-Familie reguliert, von denen bislang sieben Homologe identifiziert sind (Sirt1-7) (Frye 1999). Diese sind Homologe von SIR2 (silent information regulator), welches in der Hefe *S. cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae*) entdeckt wurde und als Gründungsmitglied der Sirtuine gilt (Kaeberlein et al. 1999). Es stellt Chromatin ruhig, indem es die Histone deacetyliert und verlängert so die Lebenszeit von Hefen, Würmern und Fruchtfliegen (Chen und Guarente 2007). Alle Sirtuine besitzen eine 200-275 Aminosäuren lange Domäne, die eine große Ähnlichkeit aufweist (Frye 2000). Sie können in vielen verschiedenen Organismen gefunden werden, wie Hefen, Fruchtfliegen, Würmern und auch dem Menschen (Denu 2005). Hier sind Sirt1 und Sirt2 im Zytoplasma und im Nukleus

lokalisiert, während Sirt6 und Sirt7 nur im Zellkern zu finden sind (Michishita et al. 2005). Sirt3-5 sind weit überwiegend in den Mitochondrien anzutreffen (Lombard et al. 2007; Huang et al. 2010), wobei aber Sirt3 bereits auch im Nukleus nachgewiesen wurde (Schwer und Verdin 2008; Shoba et al. 2009). Alle Sirtuine fungieren als Deacetylasen, zudem katalysieren sie enzyspezifisch weitere posttranslationale Reaktionen, wie ADP-Ribosylierung, Desuccinylierung und Demalonylierung (Haigis und Guarente 2006; Pan et al. 2011; Park et al. 2013). Sirtuine werden auch als sensible Sensoren des Redox-Status der Zelle angesehen, da sie für ihre Aktivität als Deacetylasen NAD^+ als Akzeptor des Lysinrestes benötigen (Yu und Auwerx 2009).

Sirt1 zog bislang besonders großes wissenschaftliches Interesse auf sich, da eine erhöhte Expression von Sirt1 durch pleiotrope Effekte auf den Energiestoffwechsel im Rahmen einer kalorischen Restriktion in unterschiedlichen Organismen zu einer Verlängerung der Lebenszeit führte. Außerdem wurde entdeckt, dass das in Rotwein vorkommende Polyphenol Resveratrol die Aktivität von Sirt1 positiv beeinflussen und so antiapoptotische Effekte bewirken kann (Ulakcsai et al. 2015; Zhang et al. 2015).

Sirtuine haben viele verschiedene Funktionen. Sirt1 und Sirt2 regulieren beispielsweise den Zellzyklus, die Antwort auf oxidativen Stress, und den Stoffwechsel über die Substrate PGC1 α , Tumorsuppressorgen p53, Proteinkinase B AKT, Histon H3 und H4, sowie Forkhead transcription factor subclass O (FOXO) (Dryden et al. 2003; Yi und Luo 2010; Brunet et al. 2004; Leiser und Kaeberlein 2010; Yu und Auwerx 2010; Michan und Sinclair 2007; Yi und Luo 2010). Sirt6 und Sirt7 steuern DNA-Reparatur, Genomstabilität und rRNA (ribosomale Ribonukleinsäure) -Transkription, indem sie auf die Proteine Histon H3K9 und p53, sowie auf das Enzym RNA Polymerase I einwirken (McCord et al. 2009; Michishita et al. 2008; Schwer et al. 2010; Ford et al. 2006; Mostoslavsky et al. 2006). Sirt3 und Sirt5 regulieren den mitochondrialen Energiesubstratstoffwechsel, unter anderem die Fettsäureoxidation und den Citratzyklus, über Deacetylierung der Acetyl-CoA Synthetase 2 (AceCS2), der Isocitrat-Dehydrogenase 2 (IDH2), der Glutamatdehydrogenase (GDH), des Histon H4 oder von Cytochrom C (Lomb et al. 2010; Nakagawa et al. 2009; Verdin et al. 2010; Huang et al. 2010).

5. Sirtuin 4

Sirt4 ist eines der drei mitochondrialen Sirtuine, über das, im Gegensatz zum gut untersuchten Sirt3, bislang nur wenig bekannt ist. Sirt4 wird in Geweben mit hohem Stoffwechselumsatz, wie Niere, Leber, Gehirn und Herz, stark exprimiert. Dort ist Sirt4 in der mitochondrialen Matrix von murinen und humanen Zellen lokalisiert (Haigis und Guarente 2006). Sirt4 spielt verschiedene Rollen in der Regulation unterschiedlicher Stoffwechselwege. So besitzt es die Fähigkeit, durch ADP-Ribosylierung und sogleich Hemmung der GDH die Aktivität des Citratzyklus zu beeinflussen (Haigis und Guarente 2006; Ahuja et al. 2007). Außerdem konnte erst kürzlich nachgewiesen werden, dass Sirt4 durch die Deacetylierung der Malonyl-CoA Decarboxylase (MCD) eine Abnahme der Fettsäureoxidation bewirken kann (Laurent et al. 2013). Des Weiteren wirkt Sirt4 als Lipoamidase, welche die Aktivität des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes hemmt und somit die Glukoseoxidation hemmt (Mathias et al. 2014).

Obwohl Sirt4 bisher nur wenig untersucht wurde, konnten einige wichtige Entdeckungen gemacht werden. So soll Sirt4 unter anderem Einfluss auf das Wachstum von Tumoren haben. In Sirt4^{-/-} Mäusen entwickelten sich spontan Lungentumore, während die Expression von Sirt4 zu einer Unterdrückung der Tumorentwicklung in vivo beitrug (Csibi et al. 2013; Jeong et al. 2014). Beim Messen des Sirt4-Gehaltes in Karzinomen von Blase, Brust, Colon, Magen und Ovarien konnte ein niedrigerer Sirt4-Gehalt im Vergleich zu normalem Gewebe gefunden werden (Csibi et al. 2013). Diesen Ergebnissen zufolge könnte Sirt4 eine Rolle als Tumor-Suppressor spielen. Darüberhinaus soll Sirt4 den Fettstoffwechsel mitregulieren. Sirt4^{-/-} Mäuse wiesen eine erhöhte MCD-Aktivität und einen erniedrigten Malonyl-CoA Gehalt im Skelettmuskel und im weißen Fettgewebe auf. Folglich zeigten diese Mäuse einen deregulierten Fettstoffwechsel, welcher zu einer erhöhten Belastbarkeit und zum Schutz vor Diät-induzierter Adipositas führte (Laurent et al. 2013). Beschrieben wurde weiterhin, dass Sirt4 in Beta-Zellen des Pankreas über ADP-Ribosylierung der mitochondrialen Glutamat-Dehydrogenase die Insulinsekretion hemmt (Ahuja et al. 2007). Außerdem wurde Sirt4 im Zusammenhang mit der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP), einer Proteinpore in der inneren Mitochondrienmembran, die beim Öffnen zum Anschwellen der Mitochondrien

und so zum Zelltod führen kann, untersucht. Es wurde festgestellt, dass Sirt4 die Öffnung der mPTP durch Aktivierung von Cyclophilin D bewirkt. Entsprechend führt Fehlen von Sirt4 zu einer verminderten mPTP-Öffnung (Verma et al. 2013). Über die Funktion von Sirt4 im Herzmuskel gibt es bislang lediglich eine einzige Studie. In dieser wurde nachgewiesen, dass Sirt4 eine kardiale Hypertrophie, Fibrose und somit Dysfunktion durch erhöhte ROS-Level verstärkt (Luo et al. 2016).

6. Myokardialer Ischämie-Reperfusionsschaden

Der akute Myokardinfarkt ist jedes Jahr für den Tod von Millionen Menschen weltweit verantwortlich und ist die Hauptursache der chronischen Herzinsuffizienz (Keeley et al. 2003; Katz 2000). Ein Herzinfarkt wird ausgelöst durch den thrombotischen Verschluss einer Koronararterie. Die Zeitspanne, in der das Gefäß verschlossen ist, wird als Ischämie bezeichnet. Während der Ischämie kann das Myokard nicht mit Sauerstoff versorgt werden, so dass es zum Stillstand der oxidativen Phosphorylierung kommt und durch die anaerobe Glykolyse kann nur kurzfristig genug ATP zur Erhaltung der Kontraktionsfunktion und der zellulären Integrität zur Verfügung gestellt werden. Daher geht das ischämische Myokard, welches von der betroffenen Kranzarterie versorgt wird, nach einer gewissen Zeit ohne Blutversorgung zugrunde. Je länger keine Sauerstoffzufuhr besteht, je mehr Zellen werden nekrotisch. Daher muss das verstopfte Gefäß so schnell wie möglich wieder eröffnet werden, beispielsweise durch einen Herzkathetereingriff, um den Blutfluss wieder herzustellen. Das Ausmaß der kardialen Schädigung wird allerdings nicht nur von der Dauer der Ischämie bestimmt, sondern ebenfalls durch die Reperfusion, also der Wiederherstellung des Blutflusses (Murphy und Steenbergen 2008; Powers et al. 2007). Deswegen wird dieser Schaden auch zusammenfassend als Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R) bezeichnet. Hiervon kann der Reperfusionsschaden bis zu 50% des gesamten I/R-Schadens bei Infarktpatienten ausmachen (Yellon und Hausenloy 2007). Da man die Ischämiephase nicht beeinflussen kann, ist praktisch eine therapeutische Beeinflussung des Infarktes nur während der Reperfusion möglich, beispielsweise während der Herzkatheteruntersuchung. Trotz zahlreicher vielversprechender Studien im Tiermodell, in denen durch unterschiedliche

pharmakologische Interventionen der Reperfusionsschaden reduziert werden konnte, konnte allerdings bislang noch keine dieser Interventionen erfolgreich in die Klinik übernommen werden. Da die Reperfusion trotz ihrer schädigenden Eigenschaften aber zwingend zur Erhaltung des ischämischen Myokards notwendig ist, bleibt die Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen des Reperfusionsschadens sowie deren Beeinflussung wissenschaftlich von großem Interesse (Yellon und Hausenloy 2007; Hausenloy 2003).

Verschiedene Mechanismen tragen zum I/R-Schaden im Herzen bei, wie etwa erhöhte ROS-Bildung, Peroxynitrit-Ansammlung, endotheliale Dysfunktion, Thrombozytenaggregation und Mikroembolisation, Aktivierung des Immunsystems, Apoptose, Autophagie und mitochondriale Funktionsstörungen (Matsui et al. 2007; Murphy und Steenbergen 2008; Piper et al. 1993; Zweier und Talukder 2006; Zweier et al. 2001). Mitochondriale Funktionsstörungen spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des I/R-Schadens, weshalb hier näher auf die genauen pathophysiologischen Mechanismen eingegangen werden soll. Während der Ischämie hemmt das Fehlen von O₂ die Atmungskette, dadurch kommt es zu verminderter myokardialer ATP-Regeneration. Die Zelle versucht daher mittels anaerober Glykolyse genügend ATP zu synthetisieren, was jedoch auf Dauer nicht möglich ist. Durch die anaerobe Glykolyse fällt vermehrt Laktat an, was zum intrazellulären Absinken des pH-Wertes unter 7 führt. Durch den niedrigen pH-Wert kommt es zur Aktivierung des Na⁺/H⁺-Antiporters, wodurch sich Na⁺ in der Zelle ansammelt. Weil ATP fehlt, kann der ATP-abhängige Na⁺/K⁺-Transporter diesen erhöhten Na⁺-Gehalt nicht ausgleichen. Deswegen aktiviert wiederum das Na⁺ den Na⁺/Ca²⁺-Antiporter, welcher Na⁺ aus der Zelle heraus und dafür Ca²⁺ in die Zelle hinein befördert. So kommt es zu einer Anhäufung von Ca²⁺ in der Zelle bereits während der Ischämiephase (Hausenloy und Yellon 2013).

In der Reperfusion kommt es zu einem plötzlichen Wiedereinfluss von großen Mengen O₂ und damit zu einer verstärkten Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS). Diese werden in den Myozyten hauptsächlich durch die mitochondriale Elektronentransportkette generiert, indem Sauerstoff bei Wiederanlaufen des Stoffwechsels nach der Ischämie unvollständig reduziert wird (Zweier et al. 1987a; Zweier et al. 1987b; Zweier und Talukder 2006). Zusätzlich wird durch

ROS die mPTP aktiviert und löst daraufhin selbst eine weitere ROS-Bildung aus, die wiederum ROS-Bildung in benachbarten Mitochondrien induziert. Dieser Mechanismus wird auch als mitochondriale ROS-induzierte ROS-Freisetzung bezeichnet (Zorov 2000). Die großen Mengen von ROS können nun durch Lipidperoxidation die Zellmembran schädigen, so dass es zu einer erhöhten Permeabilität der Membran kommt, die Zelle anschwillt und es zur Lyse der Zelle kommen kann. Außerdem können ROS eine Vasokonstriktion und eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen bewirken, sowie neutrophile Granulozyten aktivieren (Granger 1988). Durch die Interaktion der neutrophilen Granulozyten und der Adhäsionsmoleküle kommt es zu einer Akkumulation von Granulozyten in Mikrogefäßen. Neutrophile Granulozyten, die in das infarzierte Gewebe migrieren, bewirken dort eine Entzündungsreaktion (Granger et al. 1989; Zweier und Talukder 2006). Ein weiterer Faktor, der zu Zellschäden führt ist ein Ca^{2+} -Overload. Schon in der Ischämiephase werden große Mengen Ca^{2+} in der Zelle angesammelt. In der Reperfusion schädigen ROS das Sarkoplasmatische Retikulum, so dass es zu einem weiteren unkontrollierten Anstieg von Ca^{2+} kommt. Da sich das Membranpotential durch die Verfügbarkeit von O_2 in der Reperfusionsphase wieder normalisieren kann, wird durch den Ca^{2+} -Uniporter zusätzliches Ca^{2+} ins Mitochondrium transportiert. Diese großen Mengen von Ca^{2+} triggern einerseits die Öffnung der mPTP und schädigen so die Mitochondrien (Halestrap 2006). Andererseits schädigt das Ca^{2+} die Zellmembran der Myokardzellen durch Lipidperoxidation, wodurch es zu einer Hyperkontraktur der Muskelzellen kommen kann (Piper 1998). Durch das Vorhandensein von ATP in der Reperfusion kann sich außerdem der pH-Wert wieder normalisieren, was zur Öffnung der mPTP und ebenfalls zur Hyperkontraktur der Kardiomyozyten beiträgt (Lemasters et al. 1996).

Die Öffnung der mPTP gilt als ein wesentlicher Mechanismus, der an der Ausbildung des myokardialen I/R-Schadens beteiligt ist (Baines et al. 2005; Di Lisa et al. 2011; Heusch et al. 2010). Die mPTP ist eine nicht-selektive Pore in der inneren Mitochondrienmembran, deren genaue Zusammensetzung bisher nur unvollständig verstanden ist. Man vermutet, dass die Hauptbestandteile der Adenin-Nukleotid-Transporter (ANT) in der inneren Membran und der spannungsabhängige Anionenkanal in der äußeren Membran (VDAC) sind, und dass die Porenformation durch das Binden von Cyclophilin D (Cyp D) an den

Komplex reguliert wird (Bernardi et al. 2006; Szabó et al. 1993; Woodfield et al. 1998). Es konnte festgestellt werden, dass Mäuse mit Kardiomyozyten, die kein Cyp D exprimieren können, bei der Aktivierung der mPTP durch Ca^{2+} deutlich kleinere Infarkte nach I/R zeigten (Baines et al. 2005). Normalerweise ist die innere mitochondriale Membran undurchlässig für Ionen und Proteine. Die geöffnete mPTP lässt allerdings Ionen und Substanzen bis 1,5 kDa Molekulargewicht durch, wozu auch NAD^+ gehört (Di Lisa et al. 2001; Halestrap 1999). Das Membranpotential bricht daraufhin zusammen und es kommt zu einer Schwellung des Mitochondriums und letztendlich zur Ruptur der äußeren Membran (Di Lisa et al. 2001; Halestrap et al. 2004; Heusch et al. 2010; Zorov et al. 2009). Die mPTP bleibt während der Ischämie im wesentlichen geschlossen und öffnet sich erst relevant in der Reperfusionphase, bedingt durch die optimalen Voraussetzungen zur Öffnung: die Wiederherstellung des pHs und die großen Mengen von ROS und Ca^{2+} (Griffiths und Halestrap 1995).

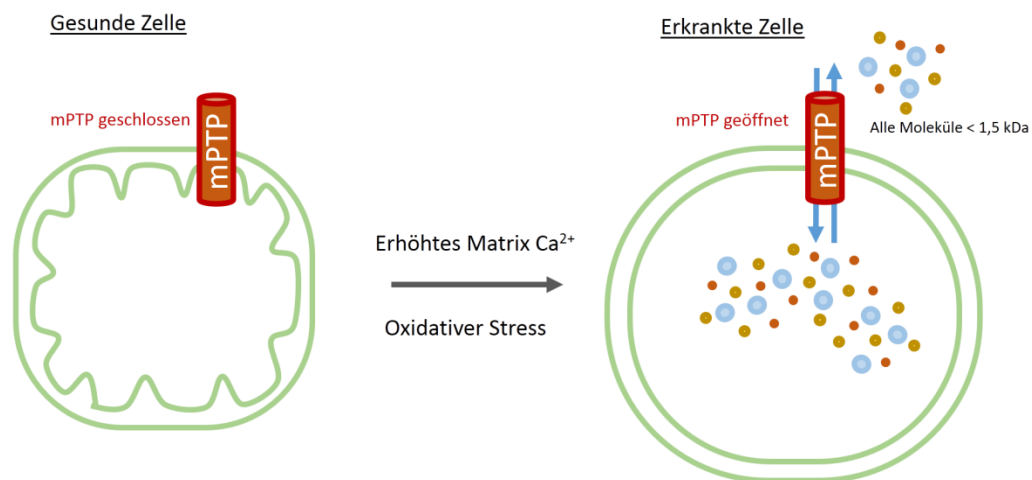


Abbildung 5: Schematische Darstellung der geschlossenen und geöffneten mPTP. Erhöhte Ca^{2+} (Calcium)-Konzentrationen und ROS (reaktive Sauerstoffspezies) begünstigen die Öffnung der mPTP (mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore). In der Folge sind Mitochondrienmembranen für alle Moleküle $< 1,5$ kDa (Kilodalton) frei permeabel, was zur Schwellung und Ruptur von Mitochondrien und daher zum Zelltod führen kann.

Angeichts der zentralen Rolle der mPTP in der Ausbildung des Reperfusionsschadens stellt die Hemmung der mPTP einen vielversprechenden Ansatz zur Abschwächung des I/R-Schadens dar. Es konnte im Tiermodell bereits nachgewiesen werden, dass eine Hemmung der mPTP durch Cyclosporin A

möglich ist und die Infarktgröße um 40-50% reduziert werden kann (Hausenloy et al. 2003; Argaud et al. 2005; Skyschally et al. 2010). Klinische Studien, die eine Hemmung der mPTP bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt testeten, konnten allerdings bislang keine relevante Reduktion der Infarktgröße bewirken.

7. Hypothese

Sirtuin 4 (Sirt4) ist eine mitochondriale NAD⁺-abhängige ADP-Ribosyltransferase (Ahuja et al. 2007), Lysin-Deacetylase (Laurent et al. 2013) und Lipoamidase (Mathias et al. 2014), die bislang wenig charakterisiert ist, und deren Funktion im Herzen trotz deutlicher kardialer Expressionsspiegel nahezu unbekannt ist. Erst kürzlich wurde herausgefunden, dass Sirt4 eine vermehrte Öffnung der mPTP durch Aktivierung von Cyp D hervorruft. Entsprechend führte Fehlen von Sirt4 zu einer verminderten Öffnung der mPTP (Verma et al. 2013). Da es während der I/R zu einem Verlust an mitochondrialem NAD⁺ kommt, könnte die Aktivität der mitochondrialen Sirtuine, einschließlich Sirt4, reduziert sein. Wir haben daher die Hypothese aufgestellt, dass eine Hemmung der Sirt4-Aktivität während der Ischämie-Reperfusion aufgrund einer NAD⁺-Depletion durch Verhinderung der mPTP-Öffnung der Größenzunahme eines Herzinfarktes entgegenwirken könnte. Es war daher das Ziel dieser Arbeit, die Rolle von Sirt4 in der Ausbildung des kardialen I/R-Schadens anhand geeigneter Tiermodelle zu untersuchen.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Geräte

Tabelle 1: Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Discofix-3, Dreiwegehähne	Fa. Braun AG, Melsungen
Foxy AL-300	Fa. Ocean Optics, Dunedin, Florida, USA
Gaswaschflasche Drechsel mit Glasfilter	Fa. Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Glasapparaturen Perfusionssystem	Fa. Glasbläserei Harald Kind, Leipzig
Manostat Precision Analog Pump Vera	Fa. Thermo-Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Mikro Tip Katheter 2F	Fa. Millar, Houston, Texas, USA
Powerlab 8/30	Fa. ADInstruments, Spechbach
Pressure Control Unit TC-510	Fa. ADInstruments, Spechbach
Quad Bridge Amp	Fa. ADInstruments, Spechbach
Stativklemmen, Muffen, Dreifingerklemmen	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Stativplatte 20x 30 cm	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt
Stativplatte 40 x 40 cm	Geschäftsbereich Technik, Universitätsklinik Freiburg i.Br.
Swinnex Filterhalter	Fa. Merck-Millipore, Darmstadt
Szintilationsgefäßständer	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt
Trichter	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt

Tygon R3603-Schläuche	Fa. Saint-Gobain, Courbevoie, Frankreich
USB 4000	Fa. Ocean Optics, Dunedin, Florida, USA
USB-LS-450	Fa. Ocean Optics, Dunedin, Florida, USA
Vakuumfiltrationsgerät	Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Wasserbad E100 und T600	Fa. Lauda, Lauda-Königshofen
„Super Trim“ Rasierer	Wahl Corp., IL, USA
Isoflurane Vapor 19.3	Drägerwerk AG, Lübeck
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Schott AG, Mainz
Präparierbesteck (Pinzette, Schere, Nadelhalter)	Fine Science Tools, CA, USA
Rippenspreizer	Fine Science Tools, CA, USA
Rotlichtlampe	Beurer Medical GmbH, Ulm
RTM3 Flowmeter	Technologie Medicale, Noisy-Le- Sec, Frankreich
Spatel	VWR International GmbH, Darmstadt
TOPO Small Animal Respirator	Kent Scientific, Torrington, CT, USA
Tygon R3607 (5/3mm) Schläuche	Saint-Gobain, Frankreich
Zeis Stemi 2000-C Stereomikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Digitalkamera	Canon, Chichibu, Japan
Discofix-3, Dreiwegehahn	B. Braun AG, Meslungen
Kupferdraht 1,5mm	Kemo-Electronic GmbH, Geestland
Perfusor-Spritze 50ml	B. Braun AG, Meslungen
Stativstange	VWR International GmbH, Darmstadt
Absaugpumpe	Drägerwerk AG, Lübeck
ELISA-Reader „SpectraMaxPlus“	Molecular Devices, München

Homogenizer	Glas-Col, IN, USA
Mitocell S200 Micro Respirometry System: 782 oxygen meter 1302 oxygen electrode MT200A respirometer	Strathkelvin Instruments, Scotland
pH-Meter 766 calimatic	Knick GmbH, Berlin
Analysenwaage Kern ABJ	Fa. Kern und Sohn GmbH, Balingen
Autoklav	H+P GmbH, Oberschleißheim
Demineralisierungsanlage Milli-Q®	Fa. Merck Millipore, Darmstadt
Dispergierstab T10 basic Ultra-TURRAX	Fa. IKA, Staufen
Eismaschine	Ziegra GmbH, Isernhagen
Elektrophoresesystem „Criterion“	Fa. BioRad, München
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Gefrierschränke, Kühlschränke	Liebherr GmbH, Kirchdorf
Gemini EM Microplate Reader	Fa. Molecular Devices, München
Heizblock	Fa. VWR, West Chester, USA
Laptop	Dell, Round Rock, TX, USA
Magnetrührer C-Mag HS 10	IKA GmbH, Staufen
Reagenzglasschüttler „Reax Top“	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Shaker „Vortex Genie“	Scientific Instruments, NY, USA
Spülmaschine	Miele KG, Gütersloh
Thermocycler	Fa. Biometra, Göttingen
Tischwaage CS200	Ohaus, NY, USA
Tischzentrifuge 5415 D	Fa. Eppendorf, Hamburg
Western Blot-System „Criterion“	Fa. BioRad, München
Wippschüttler	Fa. Irf-Labortechnik, Wasserburg
Zentrifuge Avanti J-30I	Beckmann-Coulter, Fullerton, CA, USA

1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
96-Well Mikrotiterplatten	Fa. Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Aluminiumfolie	VWR International GmbH, Darmstadt
Augensalbe Bepanthen	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Blotting Membran	Fa. Millipore, Billerica, USA
CF X96 Real-Time PCR System	Fa. Bio Rad, München
Chirurgischer Seidenfaden 4-0	Fa. SMI, St. With, Belgien
Chirurgisches Besteck	Fa. Roboz Instr., Gaithersburg, USA
Dialysemembran MWCO: 12-14000	Fa. Spectrum B.V., Breda, Niederlande
Durapore-Tape	3M Corp., St.Paul, MN, USA
Einmalskalpell, Erlenmeyerkolben	Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Konische Röhrchen „BD Falcon“	Fa. BD, New York, USA
Erlenmeyerkolben	Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Faltenfilter	Fa. Macherey-Nagel, Düren
Glasfilter und –vorfilter	Fa. Merck-Millipore, Darmstadt
Kimtech Wischtücher (weiß)	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz
Konische Röhrchen, „BD Falcon“	Fa. BD, New York, USA
Magnetständer Dynal-MPC-S	Fa. Invitrogen, USA
Messbecher	Roth GmbH, Karlsruhe
Messzylinder	Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Mikroliterspritzen	Fa. Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Nahtmaterial 4-0 (Vicryl)	Ethicon, Norderstedt
Nahtmaterial 8-0 (Vicryl)	Ethicon, Norderstedt
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen

Oliven	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Petrischale, Glas, D = 150 mm	Fa. Duran Group GmbH, Wertheim/Main
Petrischalen, Plastik	Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Pipetten, Pipettenspitzen	Fa. Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Fa. Eppendorf, Hamburg
PVDF-Membran	Fa. Millipore, Bedford, USA
Q-Tips	Carl Roth, GmbH, Karlsruhe
Rasierklingen	Carl Roth, GmbH, Karlsruhe
Reaktionsgefäße	Fa. Sarstedt, Nürnberg
Reduktionsstücke	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Schlauchklemmen nach Pean	Fa. VWR International GmbH, Darmstadt
Schöpfkelle	VWR International GmbH
Schutzbrille	Uvex
Silikonstopfen	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Spritzen und Kanülen	Fa. B. Braun AG, Melsungen
Stickstoffbehälter	Isotherm, KGW
Stripetten	Fa. Corning Incorporated, New York, USA
Thermohandschuhe	Cyro-Gloves Tempshield
Tube LAD-Ligatur Intramedic Polyethylene	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Vacutainer	Fa. BD, New York, USA
Verschlussklammern	Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Wachspapier zum Abdichten	Parafilm M, Bemis
Wägebapier	Machery-Nagel GmbH, Düren
Whatman Papier, Schwämme	Fa. Bi-Rad, München
Y-Verbindungsstücke	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG

Zelletten

Lohmann & Rauscher GmbH,
Neuwied

1.3. Chemikalien

Die Reagenzien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Merial (Hallbergmoos), B. Braun AG (Melsungen), Air Liquide S.A. (Paris, Frankreich), Mettler-Toledo AG (Schwerzenbach, Schweiz), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), Bayer (Leverkusen), RB Pharmaceuticals Limited (Berkshire, UK), Santa Cruz Biotechnologies (Dallas, TX, USA) und cp-pharma (Burgdorf) bezogen.

Tabelle 3: Chemikalien

Reagenz	Hersteller
2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC)	Sigma Aldrich
2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma Aldrich
2-Propanol (C ₃ H ₈ O)	Sigma Aldrich
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma Aldrich
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma Aldrich
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma Aldrich
Antikörper Western Blot	Santa Cruz Biotechnologies
Albumin (BSA + FFA)	Sigma Aldrich
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich
Buprenorphin 0,324mg/ml	RB Pharmaceuticals Limited
Cholat (C ₂₄ H ₄₀ O ₅)	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
Elektrolytlösung für pH-Meter	Mettler-Toledo
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Sigma Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma Aldrich
Evans Blue	Sigma-Aldrich
Flüssiger Stickstoff	Airlíquide

Glukose 5% Injektionslösung	B. Braun AG
Glutamat (C ₅ H ₉ NO ₄)	Sigma Aldrich
Heparin-Natrium	B. Braun AG
Isotone Kochsalzlösung 0,9%	B. Braun AG
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma Aldrich
Ketamin 10% (Ketaminhydrochlorid)	cp-pharma
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma Aldrich
Malat (C ₄ H ₆ O ₅)	Sigma Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich
Pentobarbital-Natrium	Merial
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich
Protease Subtilisin A	Sigma Aldrich
Saccharose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Sigma Aldrich
Salzsäure rauchend 37%	Sigma Aldrich
Softasept N farblos	B. Braun AG
Tris-Acetat (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma Aldrich
Xylazinhydrochlorid (Rompun) 2%	Bayer Vital GmbH

1.4. Oligonukleotide

Tabelle 4: Sequenzen der Primer für die PCR (Genotyping)

Gen	Primer	Nukleotidsequenz (5´-3´)
Sirt4 com		GTCACCATTTGTAGGTGCTGAG
Sirt4 WT		AGAGCCCAGTGTGCTGGGTTG
Sirt4 KO		GTCTGTCCTAGCTTCCTCACTG
9543	Transgene Forward	ATGACAGACAGATCCCTCCTATCTCC
9544	Transgene Reverse	CTCATCACTCGTTGCATCATCGAC
oIMR8744	Internal Positive Control Forward	CAAATGTTGCTTGTCTGGTG
oIMR8745	Internal Positive Control Reverse	GTCAGTCGAGTGCACAGTTT

0064-HAT-21691hom	TGTCCTTAGAAAACACATATCCAGGGTTTAGG
0065-HAT-21692hom	CTGGCTTAAAGACAACATCTGGGAGAAAAA
0061-HAT-STOP-2761	CATGGTAAGTAAGCTTGGGCTGCAGG
0062-HAT-20750seq	ACGTCAGTAGTCATAGGAACTGCGGTCG

1.5. Versuchstiere

In den vorliegenden Experimenten wurden männliche Individuen aus 4 unterschiedlichen Mäusegruppen untersucht.

Zuerst wurde mit einem Knockout-Modell gearbeitet, in dem das Sirt4-Gen, welches auf Chromosom 5 liegt, global ausgeschaltet wurde. Hierzu wurden die Exone 1-3 des Sirt4 Gens durch ein LacZ-Gen ausgetauscht. Diese Mäuse werden im Folgenden als Sirt4-Knockout-Mäuse (Sirt4^{-/-}) bezeichnet und mit den zugehörigen Wildtypen (Sirt4^{+/+}) verglichen. Sie wurden uns freundlicher Weise von der Arbeitsgruppe Haigis zur Verfügung gestellt und hatten den genetischen Hintergrund des Stammes 129S1.

In einem nächsten Schritt wurden die Experimente in einem transgenen Mausmodell durchgeführt. Hierzu wurde mit dem cre-lox-Rekombinations-System gearbeitet, welches ein gezieltes Entfernen von DNA-Sequenzen in lebenden Organismen ermöglicht. Wir bezogen eine homozygote kardiomyozyten-spezifische Sirt4 überexprimierende Maus bei der Firma Genoway, in der die transgene Sirt4 Expression mittels eines Stop-Codons abgeschaltet war. Das Stop-Codon ist hierbei von LoxP-Sequenzen flankiert. Um die transgene Sirt4-Expression anzuschalten, erfolgte eine Verpaarung dieser geflochten Mäuse mit hemizygoten α -MHC(alpha myosin-heavy chain)-Cre-(cyclization recombination)-Mäusen. Cre ist ein Enzym, welches zur Klasse der Rekombinasen gehört und die Spaltung und anschließende Neuverknüpfung von DNA zwischen spezifischen Basensequenzen (wie z.B. in der LoxP-Sequenz) katalysiert. Da die Expression von Cre über den α -MHC Promotor läuft, wird Cre in diesen Mäusen ausschließlich in Kardiomyozyten exprimiert, so dass die Überexpression von Sirt4 ausschließlich in Kardiomyozyten erfolgt. Hierbei bindet die Cre-Rekombinase an die loxP-Flanken, schneidet das Stop-Codon heraus und disinhibiert somit die transgene Sirt4 Überexpression im Herzen. Diese Mäuse werden im Folgenden cSirt4TG-Mäuse genannt (c für

cardiomyocyte-specific). Mäuse, die kein α -MHC-Cre-Gen erhalten haben, besitzen zwar das Sirt4 Transgen der Mutter, allerdings ist es auch hier noch durch das Stop-Codon deaktiviert und es handelt sich somit um nicht-exprimierende Kontrolltiere (cSirt4TG Kontrolle). Diese beiden Gruppen wurden auf C57BL/6J-Hintergrund gezüchtet.

Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 22 °C und einem Tag/Nachtzzyklus von je 12h gehalten. Futter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Alle Experimente wurden mit 8-10 Wochen alten Mäusen durchgeführt. Diese Studie wurde durch die Tierversuchskommission des Regierungspräsidiums Freiburg genehmigt (G-12/108, G-14/75).

2. Methoden

2.1. Genotypisierung

2.1.1. Lyse und DNA-Extraktion

Bei allen Mäusen, die für die folgenden Experimente verwendet wurden, wurde im Alter von 4 Wochen eine Biopsie der Schwanzspitze entnommen, um so mittels PCR den Genotyp bestimmen zu können. Um die genomische DNA zu isolieren erfolgte zuerst die Lyse der Proben, indem pro Schwanzprobe 200 μ l Lysepuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 5) sowie Proteinase K (0,2mg/ml Lysepuffer) hinzugefügt und über Nacht bei 56°C inkubiert wurde.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Lysepuffers

Tris-HCl	100 mM
EDTA	5 mM
SDS	0,2 %
NaCl	200 mM

Am nächsten Morgen wurde jeweils 200 μ l Isopropanol zu jeder Probe gegeben um die DNA auszufällen. Dann wurde der Inhalt der Eppendorfgefäße gut vermischt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 10.000 rpm bei 4°C für 20 Minuten. Anschließend

wurde das Ethanol entfernt und die DNA bei Raumtemperatur für 10 Minuten getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in jeweils 100µl ddH₂O resuspendiert.

2.1.2. Konventionelle PCR

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR) ist ein enzymabhängiges Verfahren zur Vervielfältigung bestimmter Gensequenzen einer vorliegenden DNA-Kette. Hierzu werden zwei Primer (Oligonukleotide) benötigt, die auf beiden Seiten dieser Sequenz binden und so als Startpunkt für die hitzestabile Taq-Polymerase dienen. Die Taq-Polymerase kann nun einen neuen zum ersten Strang komplementären DNA-Strang synthetisieren. Mit jedem Zyklus findet so eine exponentielle Vermehrung des DNA-Stranges statt.

Die PCR-Ansätze wurden wie in Tabelle 6 gezeigt zusammenpipettiert. Für die Sirt4^{-/-}-Mäuse erfolgte zuerst eine initiale Denaturierung bei 95°C für 3 Minuten im Thermocycler. Anschließend wurde eine PCR-Reaktion mit 35 Zyklen nach folgendem Schema durchgeführt: Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden, Primer-Annealing bei 62°C für 1 Minute, Primer-Extension bei 72°C für 30 Sekunden sowie finale Extension bei 72°C für 5 Minuten. Es wurden im Knockout-Modell heterozygote Mäuse verpaart. Zur Genotypisierung wurden hier jeweils eine WT-PCR sowie eine KO-PCR durchgeführt. Bei heterozygoten Tieren konnte je eine Bande auf Höhe der KO und WT-Bande festgestellt werden. Bei KO-Mäusen war nur eine Bande auf Höhe der KO-Kontrolle sichtbar, während bei WT-Mäusen nur eine Bande auf Höhe der WT-Bande zu erkennen war.

Tabelle 6: Zusammensetzung PCR-Reagenzien Sirt4^{-/-} und Sirt4^{+/+}

	Volumen (µl) pro Ansatz	Endkonzentration
H ₂ O	10,5	
PCR 2x Mix (Promega)	12,5	1x
10 µM ST4 Com	0,5	0,5µM
10 µM ST4 WT oder KO	0,5	0,5µM
DNA	1,0	
PCR-Volumen	25	

Für die cSirt4TG-Mäuse wurden 3 PCRs durchgeführt. Bei den Muttertieren wurden 2 PCRs gemacht, einmal um das Sirt4 Transgen nachzuweisen und als zweites eine Wildtyp PCR. Da homozygote Muttertiere für die Zucht verwendet werden sollten, wurden Mäuse mit einer Bande in der transgenen PCR, aber mit keiner Bande in der WT PCR verwendet. Bei der Verpaarung dieser homozygoten transgenen Muttertiere mit hemizygoten α -MHC-Cre Vatertieren musste in den Nachkömmlingen jetzt nur noch das α -MHC-Cre mittels einer 3. PCR nachgewiesen werden, da alle Mäuse das Transgen in sich trugen. Die PCR-Ansätze wurden wie in Tabelle 7-9 pipettiert. Die PCR-Programme waren wie folgt:

- Transgen-PCR (non-expressing): 94°C 2 Minuten, 94°C 30 Sekunden, 65°C 30 Sekunden, 72°C 5 Minuten, 72°C 8 Minuten, 35 Zyklen.
- WT-PCR: 94°C 3 Minuten, 94°C 30 Sekunden, 65°C 30 Sekunden, 72°C 1 Minute, 72°C 8 Minute, 35 Zyklen.
- α -MHC-Cre PCR (transgen expressing): 94°C 2 Minuten, 94°C 30 Sekunden, 65°C 30 Sekunden, 72°C 5 Minuten, 72°C 8 Minuten, 35 Zyklen.

Herzspezifisch Sirt4 transgen waren somit jene Nachkömmlinge, die eine Bande in der α -MHC-Cre-PCR aufwiesen. Alle anderen Mäuse wurden als non-expressing cSirt4TG Kontrolltiere verwendet.

Tabelle 7: Zusammensetzung PCR-Reagenzien cSirt4 transgen (non-expressing)

	Volumen (μl) pro Ansatz	Endkonzentration
H ₂ O	15,4	
10 X Buffer	2,5	1x
25 mM MgCl ₂	2,75	2,75 mM
10 mM dNTPs	1,25	0,5 mM
10 μ M 27461	0,75	0,3 μ M
10 μ M 20750	0,75	0,3 μ M
5 U/ μ l Taq	0,6	3 U
DNA	1	
PCR Volumen:	25	

Tabelle 8: Zusammensetzung PCR Reagenzien cSirt4TG Wildtyp

	Volumen (µl) pro Ansatz	Endkonzentration
H ₂ O	15,4	
10 X Buffer	2,5	1x
25 mM MgCl ₂	2,75	2,75 mM
10 mM dNTPs	1,25	0,5 mM
10 µM 21691	0,75	0,3 µM
11 µM 21692	0,75	0,3 µM
5 U/µl Taq	0,6	1,5 U
DNA	1	
PCR Volumen:	25	

Tabelle 9: Zusammensetzung PCR-Reagenzien α-MHC-cre Gen (transgen expressing)

	Volumen (µl) pro Ansatz	Endkonzentration
H ₂ O	15,4	
10 X Buffer	2,5	1x
25 mM MgCl ₂	2,75	2,75 mM
10 mM dNTPs	1,25	0,5 mM
10 µM cre del 27	0,75	0,3 µM
11 µM cre del 28	0,75	0,3 µM
5 U/µl Taq	0,6	1,5 U
DNA	1	
PCR Volumen:	25	

2.1.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Stränge wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit bekannten DNA-Sequenzen, die als Marker dienten, verglichen. Hierzu wurde 1-2%iges Agarosegel hergestellt, indem 1g Agarose in 50ml 1x TAE für 1,5 Minuten in der Mikrowelle erhitzt wurde. Anschließend wurden 8µl

Ethidiumbromid pro 50ml Agarosemix hinzugefügt und gut vermischt. Nachdem das Gel nach etwa 30 Minuten erhärtet war, wurden die Proben aufgetragen und die Gelelektrophorese bei 100 Volt für 30 Minuten durchgeführt. Die aufgetrennten Banden konnten dann mittels eines UV-Transluminators dargestellt und fotografiert werden.

2.2. Herzgewicht/Körpergewicht und Tibia/Körpergewicht-Verhältnis

Die Mäuse wurden gewogen und anschließend mit 200 mg/kg Thiopental euthanasiert. Nachdem keine Reflexe mehr feststellbar waren, wurde das Herz entnommen und gewogen. Anschließend wurde die Tibia eines Beines freipräpariert und gemessen.

2.3. Herstellung von Homogenaten

Zur Herstellung von Herzhomogenat wurde die Hälfte eines Herzens in flüssigem Stickstoff gefroren und dann mit Hilfe eines Mörsers unter flüssigem Stickstoff zerstoßen. Zur Herstellung von Homogenat anderer Gewebe wurde eine entsprechende Menge von Leber, Niere oder Muskel entnommen, ebenfalls in Stickstoff gefroren und mit einem Mörser zerstoßen. Daraufhin wurde das Gewebe in 500µl Homogenisierungspuffer (Tab. 10 und 11) in 4ml Tubes auf Eis überführt und mittels eines Homogenisierungsstabes homogenisiert. Dann wurde das Gemisch für 1 Stunde bei 4°C inkubiert und anschließend für 1 Stunde bei 12.300 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur weiteren Verwendung wurde eine Proteinbestimmung mittels BCA-Reaktion durchgeführt.

Tabelle 10: Zusammensetzung für 20 Proben (50mg Gewebe)

Homogenisations-Puffer	10 ml
Phosphataseinhibitor Cocktail 3 (Sigma)	100 µl
Phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma)	100 µl
Proteaseinhibitorcocktail (Roche)	1 Tablette

Tabelle 11: Homogenisationspuffer

Hepes	50 mM
NaCl	150 mM
Glycerol	10%
Triton X-100	1%
MgCl ₂	1,5 mM
EGTA	1 mM
Sodium Fluoride	100 mM
pH	7,5

2.4. SDS-Page und Western Blot

Abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins wurde ein 8-12%iges Polyacrylamid-Trenngel gegossen (siehe Tab. 14) und mit 1-2% Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen und ein 3%-iges Polyacrylamid Sammelgel (Tab. 13) darüber gegossen. Als Probe wurde Herzhomogenat sowie Homogenat von Leber, Niere oder Muskel (Herstellung siehe Kapitel 2.3) verwendet. Es wurden jeweils 60µg Homogenat verwendet und mit Wasser auf 10µl aufgefüllt. Dann wurde die Probe mit 10µl Laemmli-Puffer (Tab. 12) 10 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die SDS-Page (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) -Auftrennung der Proteine erfolgte bei 80-100 V in SDS-Laufpuffer (siehe Tab. 15). Um die aufgetrennten Proteine auswerten zu können müssen sie elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Diese wurde zuvor mit Methanol behandelt, da es das SDS aus den Komplexen entfernt und so die Bindung der Proteine an die Membran erhöht. Der Transfer erfolgte bei 100 V 4°C in 1 Stunde in Transferpuffer (siehe Tab. 16). Im Folgenden wurde die Membran mit PBS gewaschen und dann für 1 Stunde in 5% Milchpulverlösung geblockt, um die freien Bindungsstellen auf der Membran zu sättigen und somit unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Dann wurde die Membran 4 Mal für 5 Minuten in PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper in der Konzentration 1:500 in 5% BSA inkubiert. Nach 3 Waschschrritten mit PBS wurde der in 5% BSA gelöste

Sekundärantikörper in der Konzentration 1: 5000 aufgetragen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde dann mit dem BioRad Imaging System gescannt und das Fluoreszenzsignal der einzelnen Banden quantifiziert.

Tabelle 12: Laemmli-Puffer

Tris	65 mM
Glycerol	25%
SDS	2%
Bromphenolblau	Spatelspitze
B-Mercaptoethanol	70 mM

Tabelle 13: Sammelgel

Acrylamid	5%
Tris-Base (0,5 M; pH 6,8)	125 mM
SDS 10%	0,1%
APS 10%	0,1%
TEMED	0,2%

Tabelle 14: Trenngel

Acrylamid	8/10/12%
Tris-Base (1,5 M; pH 6,8)	375 mM
SDS	0,01%
APS	0,0075%
TEMED	0,15%

Tabelle 15: SDS-Page Laufpuffer

Tris-Base	25 mM
Glycin	190 mM
SDS	3,5 mM

Tabelle 16: Transferpuffer

Tris-Base	25 mM
Glycin	190 mM
Methanol	20%

2.5. Mitochondrienisolation

Die Versuchstiere wurden mit 200 mg/kg Thiopental i.p. euthanasiert, die Herzen entnommen und in 4ml STE1 Puffer (sh. Tab. 17) auf Eis heruntergekühlt. Auch alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis, die Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Vorhöfe wurden entfernt, die Herzen anschließend in kleine Stücke zerschnitten und durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette von Blutresten befreit. Danach wurde der STE1 Puffer verworfen und durch 4ml frischen STE1 Puffer ersetzt. Anschließend wurde das Gewebe mit einer Schere in etwa 1 mm kleine Teilchen zerkleinert. Daraufhin wurde der STE1 Puffer entfernt und es wurde 2,5ml Protease-haltiger STE2 Puffer (siehe Tab 18) zum Herzgewebe hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 4 Minuten wurde 2,5ml STE1 Puffer hinzupipettiert. Dieses Gemisch wurde nun in ein Potter Elvehjem Glas überführt. Daraufhin wurden die Herzfragmente mittels eines Stabhomogenisators für 90 Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend für 10 Minuten bei 8000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 4ml STE1 Puffer resuspendiert. Ein zweiter Zentrifugationsschritt bei 700 g für 10 Minuten folgte. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und nochmals bei 8000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Nun wurde der Überstand verworfen, das Pellet in STE1 Puffer resuspendiert und derselbe Zentrifugationsschritt bei 8000 g wiederholt. Zum Schluss wurde wieder der Überstand verworfen und das Pellet in 200µl STE 1 Puffer resuspendiert.

Tabelle 17: STE1 Puffer

Sucrose	250 mM
Tris/HCl	5 mM
EGTA	2 mM
pH	7,4

Tabelle 18: STE2 Puffer

Sucrose	250 mM
Tris/HCl	5 mM
EGTA	2 mM
BSA (FFA)	0,5 % (w/v)
MgCl ₂	5 mM
ATP	1 mM
Protease	2,5 U/ml
pH	7,4

2.6. Bestimmung des Proteingehaltes (BCA-Reaktion)

Um den Proteingehalt der isolierten Mitochondrien und der Herzhomogenate zu bestimmen wurde das Micro BCA Kit (Pierce, Rockford, IL) verwendet. Das Prinzip der BCA-Reaktion basiert darauf, dass zweiwertige Kupfer-Ionen mit den vorhandenen Proteinen reagieren und zu einwertigen Kupfer-Ionen reduziert werden. Diese einwertigen Kupfer-Ionen bilden mit BCA (Bicinchoninsäure) violette Komplexe. Die Intensität des Farbumschlags entspricht der Proteinkonzentration, welche photometrisch bei einer Wellenlänge von 562nm gemessen werden kann.

Es wurden je 10µl der Probe (1:10 verdünnt) sowie der nach Protokoll erstellten Standards (Standardkurve 0-2,5mg/ml) in eine 96 Well Platte pipettiert. Dann wurde 190µl des BCA-Mix in jedes Well hinzugefügt, für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption im ELISA-Reader gemessen.

2.7. Polarographische Atmungsmessung

Die mitochondriale respiratorische Kapazität wurde in isolierten Mitochondrien nach Bestimmung der Proteinkonzentration gemessen. Hierzu wurde eine doppelwandige Glaskammer mit einem Volumen von 0,5ml als Messkammer verwendet, die durch 25°C warmes Wasser in der Doppelwand erwärmt wurde. Der Inhalt der Kammer wurde ständig durch einen Rührmagnet vermischt. Oben ist die Glaskammer durch einen Zylinder mit kapillarer Bohrung verschlossen, durch die es möglich war mit einer Spritze Substanzen zu injizieren, ohne die Kammer öffnen zu müssen. Unten in der Kammer befand sich eine Clark-type Sauerstoffelektrode (Strathkelvin, North Lamarkshire, Schottland). Zwischen Elektrode und Reaktionskammer war eine O₂-durchlässige fluorierte Ethylen Propylen Membran angebracht. Die Elektrode bestand aus einer Kathode aus Platindraht und einer Anode aus Silberdraht, welche durch gesättigte Elektrolytlösung verbunden waren.

Der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien wurde hierbei nach der Methode von Clark gemessen (Clark et al. 1953). Die Sauerstoffmoleküle diffundieren aus der Kammer durch die Membran und werden dann an der Elektrodenkathode reduziert, so dass es zu einem Stromfluß kommt. Dieser Stromfluss ist proportional zum Sauerstoffgehalt in der Kammer. Um die Stromstärke in die dazugehörige O₂-Konzentration umzuwandeln wurde die Software 928 von Strathkelvin Instruments verwendet.

Es können 4 verschiedene "States" unterschieden werden. State 1 zeigt die Atmungsrate von Mitochondrien in Puffer ohne zusätzliche metabolische Substrate im Puffer, lediglich unter Verwendung noch vorhandener endogener Substrate. State 2 beschreibt die Atmungsrate mit metabolischem Substrat im Puffer, ohne dass ADP hinzugefügt wird, während in State 3 die maximale Atmungsrate nach Zugabe von ADP gemessen wird. Das ADP regt die ATP-Produktion an und somit auch die Atmung der Mitochondrien. In State 4 ist das ADP vollständig in ATP umgewandelt und es erfolgt eine Feedback-Hemmung des O₂-Verbrauchs.

Um eine Messung durchzuführen wurden 500µl Respirationspuffer (siehe Tab. 19) in die Kammer gegeben. Dann wurde die Elektrode für 1 Minute äquilibriert und anschließend wurden 0,3mg Mitochondrien hinzugefügt. Jetzt wurde State 2 für 90 Sekunden gemessen und daraufhin 1,5µl 200nM ADP (Endkonzentration

0,6mM) dazugegeben. Dann konnte die maximale Stimulation, State 3, gemessen werden. Nachdem das ADP verbraucht war, wurde für 4 Minuten State 4 gemessen. Für jede Probe erfolgte jeweils eine Doppelmessung mit den Substratkombinationen Glutamat/Malat oder Palmitoylcarnitin/Malat. Mit dem Strathkelvin 782 Oxygen System 4.0 wurde eine Kurve der Respirationsraten während des gesamten Experimentes aufgezeichnet. Aus dieser konnte man anschließend pro State die Respirationsrate in natom/min ablesen. Diese Rate wurde dann auf die Menge der verwendeten Mitochondrien bezogen und ergab dann den Sauerstoffverbrauch in nmol/min/mg Mitochondrien.

Tabelle 19: Respirationspuffer

KCL	120 mM
KH ₂ PO ₄	5 mM
EGTA	1 mM
BSA	1 mg/ml
HEPES	3 mM
Entweder: Glutamat/Malat	5 mM/2 mM
Oder: Palmitoyl-L-Carnitin/Malat	20 µM/5 mM

2.8. LAD-Ligatur

Um einen Myokardinfarkt im Tiermodell zu erzeugen, wurde das Modell der LAD (left anterior descending artery)-Ligatur verwendet. Für die Anästhesie wurden 100 mg/kg Ketamin und 5 mg/kg Xylazin i.p. verabreicht. Um bereits beim Aufwachen des Tieres eine Schmerzfreiheit gewährleisten zu können, wurde bereits intraoperativ 0,1 mg/kg Buprenorphin s.c. als Schmerzmittel gegeben. Auch postoperativ wurde in 8h Intervallen für 2 Tage 0,1 mg/kg Buprenorphin s.c. verabreicht. Außerdem wurden 20 µl/g einer isotonischen 5%igen Glukoselösung (in 0,9% NaCl) i.p. verabreicht, um den Blut- und Verdunstungsflüssigkeitsverlust während der OP auszugleichen. Zum Schutz der Augen wurde Augensalbe aufgetragen. Nachdem die Maus keine Reflexe mehr zeigte, wurde sie in Rückenlage auf dem OP-Tisch mit Klebeband fixiert. Mittels einer kleinen Schlinge aus Nahtmaterial wurden die Schneidezähne fixiert und der Kopf leicht nach hinten überstreckt um einen guten Zugang zum Kehlkopf zu

haben. Mit einer flexiblen Kaltlichtquelle wurde der Hals beleuchtet, um so die Trachea besser sichtbar zu machen. Mit einer Pinzette wurde die Zunge vorsichtig aus der Maulhöhle gezogen und mit einem Spatel an den Unterkiefer gedrückt. Der Kehlkopf und der Eingang in die Trachea waren als weißer Punkt sichtbar, der sich öffnete und schloss. Die Intubation erfolgte mit einer 22G-Venflon-Kanüle (Fa. Braun, Melsungen). Die Kanüle wurde dann mit der Beatmungsmaschine, TOPO Small Animal Respirator (Kent Scientific, Torrington, CT, USA), verbunden. Die Einstellungen der Beatmungsmaschine, sowie am Isofluranverdampfer waren wie folgt: Atemfrequenz 110 bpm, Sauerstoffsättigung 40%, Inspiration Pressure 10cm, Sauerstoff-Flow 0,5-1l/min., Isofluran 1%. Am Respirator war außerdem ein PEEP (positive end-expiratory pressure) von 5cm integriert, um so einem Lungenkollaps beim Öffnen des Thorax vorzubeugen. Nach erfolgreicher Intubation wurde die Maus auf die rechte Seite gedreht und die Beine dort fixiert. Die Haare auf der linken Thoraxseite wurden mit einem Rasierer geschoren und die Haut anschließend desinfiziert. Die Operation fand ab diesem Punkt unter mikroskopischer Sicht statt (Zeiss Stemi 2000-C Stereomikroskop, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena). Es wurde ein etwa 10mm langer Hautschnitt oberhalb des Herzens gemacht, dann wurde die Muskulatur stumpf freipräpariert. Zwischen der 3. und 4. Rippe erfolgte ein 8mm langer Schnitt mit dem der Thorax eröffnet wurde. Dann wurde ein Rippenspreizer eingesetzt, um einen guten Blick auf das Herz zu haben und vorsichtig das Perikard eröffnet. Jetzt wurde die A. coronaria sinistra aufgesucht und die LAD direkt nach ihrer Abspaltung aus der linken Koronararterie mit einer atraumatischen Nadel unterstoßen. Da keine vollständige Ligatur gesetzt werden sollte, sondern mit dem Modell der Ischämie/Reperfusion gearbeitet werden sollte, wurde ein erster Knoten gesetzt, ohne die Ligatur richtig zuzuziehen. Unter diese lockere Schlinge des Nahtmaterials wurde ein kleines Plastikröhrchen geschoben und erst jetzt die Ligatur mit einem zweiten und dritten Knoten richtig zugezogen. Ob die LAD richtig abgebunden war, konnte man am deutlichen Erblassen des betroffenen Herzareals erkennen. Die LAD wurde für 30 (cSirt4TG) bzw. 60 Minuten (Sirt4^{-/-}) abgebunden, währenddessen wurde der Rippenspreizer entfernt, ein nasser Tupfer auf die Wunde gelegt und die Maus mit einer Wärmelampe bestrahlt (Beurer Medical GmbH, Ulm). Nach erfolgter Ischämiezeit wurde das Plastikröhrchen vorsichtig mit einer Pinzette

herausgezogen. Wichtig war, dass die Naht im Herzen verblieb, damit eine spätere Färbung zur Bestimmung der Infarktgröße möglich war. Während der folgenden Reperfusion konnte man sehen, dass das vorher ischämische Gebiet jetzt wieder rötlicher wurde. Anschließend wurden die Mm. pectorales mit 3-4 Einzelnähten wieder verschlossen und die Haut mit einer fortlaufenden Naht zugenäht. Dann wurde das Isofluran abgedreht und sobald die Maus begann spontan zu atmen und Reflexe zeigte, wurde sie extubiert. Während der Aufwachphase wurde die Maus weiter mit einer Rotlichtlampe gewärmt und erhielt reinen Sauerstoff für etwa 30 Minuten über einen Schlauch vor der Nase.

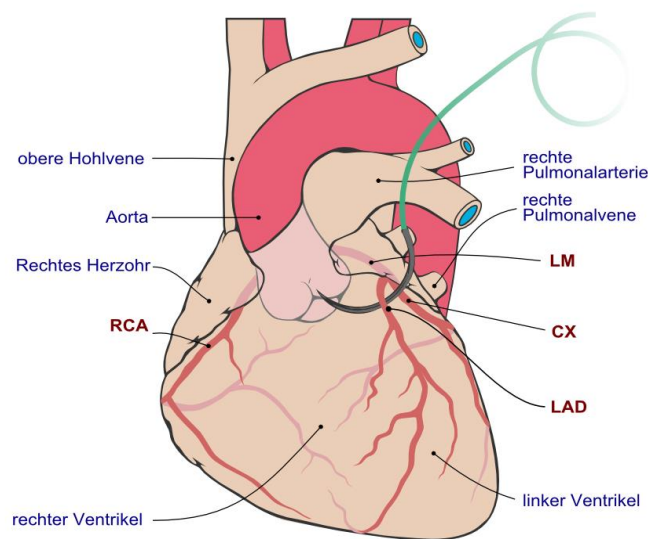


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Herzens und der Coronargefäße bei der LAD-Ligatur. Hierbei wird die LAD (left anterior descending artery) mit einer dünnen Nadel unterstochen und durch eine Ligatur eine Ischämie für einen bestimmten Zeitraum herbeigeführt. Anschliessend wird diese Ligatur wieder eröffnet, so dass eine Reperfusion erfolgen kann. So kann ein Infarkt im Bereich des linken Ventrikels herbeigeführt werden. Weitere Coronargefäße: CX (Arteria circumflexa), LM (left main coronary artery), RCA (right coronary artery) (Grafik modifiziert nach coronary arteries.svg, Patrick J. Lynch, Wikimedia commons).

2.9. Bestimmung der Infarktgröße mittels Evans Blue-TTC-Staining

24 Stunden nach erfolgter LAD-Ligatur wurden die Herzen entnommen und die Aorta kanüliert. Hierzu wurde die Maus mit 200 mg/kg Thiopental euthanasiert und es wurden nach Ausbleiben der Reflexe 200 Einheiten Heparin in die V. cava injiziert, um die Blutgerinnung zu verhindern. Dann wurde das Herz entnommen und zuerst in eine 0,9%ige NaCl-Lösung bei Raumtemperatur gegeben. Nicht-kardiales Gewebe wurde entfernt. Dann wurde das Herz in ein zweites Gefäß mit 0,9% NaCl überführt, welches vorher mit Flüssigstickstoff gekühlt worden war,

die Aorta mit einer 20 Gauge Plastikkanüle kanüliert und mit einem Seidenfaden der Stärke 4-0 fixiert. Unter die noch aus der Operation vorhandene Ligatur wurde ein kleines Plastikröhrchen geschoben, um so wieder die LAD an derselben Stelle wie während der OP zu ligieren. Anschließend wurde das kanülierte Herz an ein einfaches Langendorff-System, bestehend aus einer Spritze, einem Schlauch und einem Dreiwegehahn, angeschlossen und zuerst mit 0,9% NaCl gespült. Dann wurden 200µl einer 0,5%igen Evans Blue Lösung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) über den Dreiwegehahn in das Langendorff-System injiziert und somit das nichtischämische Areal des Herzens (Non Risk Area) blau gefärbt. Die Area at Risk (AAR) blieb ungefärbt (siehe Abbildung 7). Das Herz wurde für 30 Minuten bei -20°C eingefroren und dann mit einer Rasierklinge in dünne Scheiben geschnitten. Um das vitale Gewebe vom nekrotischen Gewebe abgrenzen zu können wurde der Farbstoff Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) verwendet. TTC ist ein farbloser Redox-Indikator, welcher die vitalen Zellen der AAR anhand einer Redoxreaktion der Pyruvatdehydrogenase rot färbt. Der nekrotische Bereich bleibt ungefärbt, so dass man nekrotische und vitale Areale visuell unterscheiden kann. Es wurde 0,1g TTC in 10ml 10x PBS gelöst und die Herzstücke zusammen mit dieser Lösung in ein Gefäß gegeben. Dieses wurde mit Alufolie umhüllt, da der Farbstoff lichtsensitiv ist. Dann wurde das Herz für 15 Minuten bei 37°C gefärbt und anschließend die Herzscheiben entnommen und mit 0,9% NaCl gespült. Jetzt konnten die Herzstücke unter einem Mikroskop fotografiert werden, gewogen werden und dann die blauen, weissen und roten Areale jedes Stückes von beiden Seiten mit dem PC-Programm Image J (NIH, Bethesda, Maryland, USA) ausgemessen werden. Um die Infarktgröße zu bestimmen, wurden Non Risk Area (blau), die Area at Risk (ischämisches Areal, blau und weiß) und nekrotisches (weiß), sowie vitales Gewebe (rot) der AAR ausgemessen und miteinander in Beziehung gesetzt.

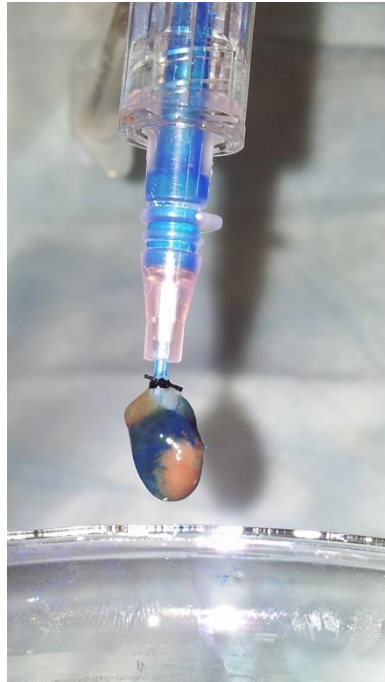


Abbildung 7: Kanüliertes Herz nach der Färbung mit Evans Blue.

2.10. Langendorff-Perfusion

2.10.1. Aufbau Perfusionssystem

Um die Kontraktilität der Herzen ex vivo untersuchen zu können, verwendeten wir die Langendorff-Perfusion nach Oscar Langendorff (Langendorff, O., 1898) unter Zuhilfenahme eines dünnen Ballons aus Folie, der in den linken Ventrikel eingebracht wurde.

Das Perfusionssystem war aus 4 doppelwandigen Glasteilen aufgebaut, die über Schläuche miteinander verbunden waren (siehe Abbildung 8). Durch die Doppelwände floss auf 38,3°C erwärmtes Wasser, so dass das Medium auf 37°C erwärmt wurde. Das System war als rezirkulierendes System aufgebaut, in dem das Herz retrograd über die Aorta perfundiert wurde. Der Puffer lief zuerst über die Aorta ins Herz, tropfte dann aus dem Herz heraus und lief unten in ein Puffer-Reservoir. Mit einer Rollenpumpe wurde der Puffer durch einen Filter mit einer Porengröße von 5µm geleitet und dann in den Oxygenator überführt. Hier wurde ununterbrochen Carbogen zugeführt, so dass es zu einer Oxygenierung des Puffers kam. Jetzt floß der Puffer wieder zurück in die Ausgleichskammer, welche sich direkt oberhalb des Herzens befand. In dieser Kammer blieben eventuell vorhandene Luftblasen zurück und der Puffer floß wieder über die

kanülierte Aorta ins Herz. Der Oxygenator wurde so hoch oberhalb des Herzens aufgehängt, dass eine hydrostatische Säule von 50 mmHg herrschte. In den linken Ventrikel wurde ein wassergefüllter Ballon aus dünner Folie eingebracht, der mit einem Druckmeßsystem gekoppelt war (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9). Hierüber konnten die kontraktile Parameter Herzfrequenz, left ventricular developed pressure (LVDP), sowie maximale und minimale Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dP/dt_{\max} und dP/dt_{\min}) gemessen und berechnet werden.

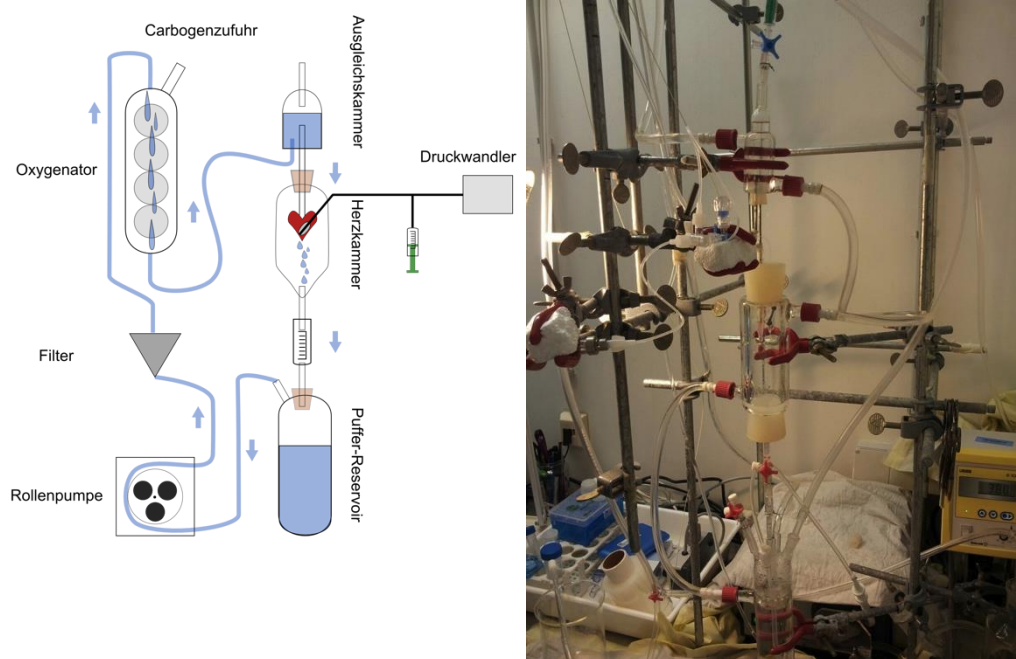


Abbildung 8: Aufbau des Herzperfusionssystems. Links schematischer Aufbau. Rechts Foto des Perfusionssystems. Die Pfeile geben die Flussrichtung des Puffers an.



Abbildung 9: Herzkammer mit kanüliertem Herz und Ballon im linken Ventrikel, der zur Druckmessung dient.

2.10.2. Perfusionspuffer

Als Perfusionspuffer diente Krebs-Henseleit-Puffer (Tab. 20), welchem 5 mM Glukose hinzugefügt wurde. Dieser entspricht von seiner Elektrolytzusammensetzung her Blut. Vor der Perfusion wurde der Puffer für 30 Minuten mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) präoxigeniert.

Tabelle 20: Krebs-Henseleit-Puffer

NaCl	128 mM
KCl	5 mM
KH ₂ PO ₄	1 mM
MgSO ₄	1,3 mM
NaHCO ₃	15 mM
CaCl ₂	2,5 mM
pH	7,4

2.10.3. Allgemeiner Versuchsablauf

Der Puffer wurde jeden Tag frisch angesetzt und für 30 Minuten mit Carbogen präoxygeniert. Ein neuer Filter wurde in das Perfusionssystem eingesetzt, der Puffer in das System gegeben und die Rollenpumpe sowie das Wasserbad angestellt. Dann wurde das Herz entnommen und die Aorta kanüliert. Um später den Ballon einsetzen zu können, wurde der linke Vorhof abgeschnitten. Danach

konnte das kanülierte Herz an das Perfusionssystem gehängt werden. Sobald der erwärmte, oxygenierte und glukosehaltige Puffer die Koronarien durchströmte, begann das Herz in seinem autonomen Rhythmus zu schlagen, verrichtete aber bei hydrostatisch geschlossener Aortenklappe keine Volumenarbeit. Dies bedeutet, dass die Ventrikel nicht gefüllt sind.

2.10.4. Messung kontraktile Parameter

Um die kontraktile Parameter des Herzens messen zu können führten wir einen blasenfreien, wassergefüllten Ballon, der zuvor aus sehr dünner Folie hergestellt worden war, durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel ein. Dieser Ballon war mit einem dünnen Polyethylenschlauch verbunden, in den ein Drucksensor (Millar Micro-Tip, Millar Instruments, Houston, TX) mündete. An diesen Schlauch war außerdem durch einen Dreiwegehahn eine 50 μ l Glasspritze angeschlossen, über die dann der Ballon gefüllt werden konnte. Der Ballon wurde so mit Wasser gefüllt, dass der enddiastolische Druck zwischen 8 und 12 mmHg lag. Durch die Kontraktionen des Ventrikelmyokards wurde Druck auf den Ballon ausgeübt und so konnte der linksventrikuläre systolische und diastolische Druck (LVP) über den Drucksensor als Maß der Kontraktilität gemessen werden. Das Signal wurde über den Druckaufnehmer an den PC übermittelt und dort mit der Software PowerLab (ADInstruments) aufgezeichnet und bearbeitet. Die Herzfrequenz (HF) wurde aus der Zeitdifferenz zwischen den systolischen Druckmaxima berechnet. Der linksventrikulär entwickelte Druck (left ventricular developed pressure, LVDP) wurde aus der Differenz von systolischem und diastolischem Druck berechnet. Außerdem wurde die linksventrikuläre maximale und minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{\max} und dP/dt_{\min}) mit der Software kalkuliert. Nach dem Anschließen des Herzens an das Perfusionssystem und dem Einführen des Ballons in den linken Ventrikel benötigte das Herz 5-15 Minuten, um sich zu adaptieren. Sobald konstante Messwerte erreicht wurden, konnte mit der regulären Messung begonnen werden. Hierbei wurden die vier oben genannten Werte alle 5 Minuten gemessen und aufgezeichnet.

2.10.5. Ischämie/Reperfusion

Die Erholung der kontraktile Funktion in der Reperfusion nach vorausgegangener Ischämie wurde in der Langendorff-Perfusion untersucht. Zuerst wurde das Herz wie oben beschrieben für 15 Minuten perfundiert. Dann

wurde der zuführende Pufferschlauch oberhalb des Herzens mit einer Klemme abgeklemmt und somit eine globale Ischämie für 25 Minuten herbeigeführt. Danach erfolgte die Reperfusion durch Entfernen der Klemme für 40 Minuten. Die Evaluation der mPTP und der ROS-Produktion erfolgte in separaten Experimenten bereits nach 15 Minuten Reperfusion. Während sämtlicher Experimente wurden alle 5 Minuten die oben aufgeführten Kontraktilitätsparameter gemessen.

2.11. „Swelling Assay“

Die Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP nach Ischämie und Reperfusion wurde mit dem „Swelling Assay“ untersucht. Bei diesem Assay wird durch die Zugabe von CaCl_2 die Öffnung der mPTP und somit ein Anschwellen der Mitochondrien induziert.

Ein Herz wurde im Langendorff-Modus für 15 Minuten normal perfundiert, dann einer 25-minütigen Ischämie ausgesetzt und für weitere 15 Minuten reperfundiert. Dann wurde das Herz abgehängt und die Mitochondrien wie bereits beschrieben isoliert. Anschließend wurde eine Mitochondrienverdünnung von 2mg/ml hergestellt, wobei zum Verdünnen der mPTP-Puffer (sh. Tab 21) verwendet wurde. Für die Negativkontrolle wurden 97,6µl Mitochondriensuspension mit 2,4µl Cyclosporin A vermischt, in ein Well einer 96 Well-Platte pipettiert und bei 25°C für 3 Minuten inkubiert. Dann wurden 100µl mPTP-Puffer, der zusätzlich 1,2mM CaCl_2 enthielt, hinzugefügt. Für die Leerprobe wurden 100µl Mitochondrien und 100µl mPTP- CaCl_2 -Puffer vermischt. Für die zu untersuchende Probe wurden 100µl Mitochondrienmix mit 100µl mPTP- CaCl_2 -Puffer zusammenpipettiert. Nach dem Hinzufügen des CaCl_2 -haltigen Puffers wurde die Absorption bei 540nm jede Minute für 6 Minuten in einem Spektrophotometer gemessen, um so die Schwellung der Mitochondrien nach Öffnung der mPTP durch das Calciumchlorid messen zu können. Das Cyclosporin A verhindert die Bildung der mPTP und konnte daher als Negativkontrolle genutzt werden. Am Ende konnte die Abnahme der optischen Dichte graphisch dargestellt werden.

Tabelle 21: mPTP-Puffer

Saccharose	200 mM
HEPES	10 mM
KH ₂ PO ₄	5 mM
EGTA	10 μM
Succinat	10 mM
pH	7,3

2.12. Amplex Red Assay

Nach 15-minütiger normaler Langendorff-Perfusion, 25 Minuten Ischämie und 15 Minuten Reperfusion wurden die Mitochondrien des Herzens isoliert. Der Amplex Red Assay ist ein Fluoreszenzassay, der die H₂O₂ Produktion misst, was letztlich aber die Produktion des sehr kurzlebigen und daher schwer direkt quantifizierbaren Superoxid-Anions reflektieren soll. Er basiert auf der Reaktion von H₂O₂ und dem farblosen Amplex Red, welches durch Horseradish Peroxidase (HRP) 1:1 zu dem farbigen fluoreszierenden Resorufin katalysiert wird und so messbar wird.

Da Amplex Red lichtsensitiv ist, musste der Assay in einem abgedunkelten Raum pipettiert werden. Es wurde eine weiße 96 Well-Platte verwendet. Zuerst wurden die Mitochondrien auf 1mg/ml verdünnt und von dieser Suspension wurden 20μl in jedes Well pipettiert (entspricht 0,02mg Mitochondrien pro Well). Dann wurde ein Amplex Red-HRP-Mix hergestellt, welcher 40μM Amplex Red sowie 8 U/ml HRP enthielt. Hier ist zu beachten, dass die Endkonzentrationen durch weitere Verdünnungsschritte im Well später nur noch die Hälfte betragen. Dann wurde eine H₂O₂-Standardkurve mit 0-100pmol pipettiert. Das Volumen von Mitochondrien und H₂O₂ in der Standardkurve wurde immer auf 100μl mit Basispuffer (sh. Tab. 22) aufgefüllt. Dann wurde in jedes Well 100μl des Amplex-Mix hinzugegeben, zu den Proben außerdem 10μl Substratpuffer (sh. Tab. 23), in alle anderen Felder 10μl Basispuffer, um das Volumen gleich zu halten. Für die Leerprobe wurden 180μl Basispuffer und 20μl Probe vermischt. Dann konnte mit der Software Softmax Pro bei einer Exzitation von 540nm und einer Emission von 590nm bei 37°C für 30 Minuten die Fluoreszenz gemessen werden. Anschließend wurde der Steigungsquotient in der Leerprobe berechnet und vom

Steigungsquotienten der Probe subtrahiert. Dieses Ergebnis war der Steigungsquotient m der Probe. Jetzt konnte mit folgender Formel der H_2O_2 -Gehalt berechnet werden:

$$((m_{\text{sample}} * 60) : 0,02 \text{ mg Mitochondrien/Well}) : m_{\text{standard}} = x \text{ pmol/min/mg Mitochondr.}$$

Tabelle 22: Basispuffer

KCl	125 mM
KH_2PO_4	4 mM
NaCl	14 mM
HEPES	20 mM
$MgCl_2$	1 mM
EGTA	0,02 mM
BSA	0,2%
pH	7,2

Tabelle 23: Substratpuffer

KCl	125 mM
KH_2PO_4	4 mM
NaCl	14 mM
HEPES	20 mM
$MgCl_2$	1 mM
EGTA	0,02 mM
BSA	0,2%
Glutamat	105 mM
Malat	42 mM
pH	7,2

2.13. Statistik

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung des Mittelwertes angegeben. Der Vergleich zweier Gruppen erfolgte mit einem zweiseitigen t-Test. Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ bezeichnet und die Signifikanz mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

IV. ERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurde die Rolle von Sirt4 in der myokardialen Ischämie-Reperfusion untersucht. Mäuse mit globalem Sirt4^{-/-} und kardiomyozyten-spezifischer Sirt4 Überexpression (cSirt4TG) wurden verwendet und mit jeweils den entsprechenden Wildtypmäusen verglichen. Der Einfluß auf die Herzinfarktgröße wurde mittels LAD-Ligation und nachfolgender TTC-Färbung untersucht, und die Erholung der Herzfunktion wurde nach Ischämie und Reperfusion im Langendorff-Modell evaluiert. Die Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP und die H₂O₂-Bildung wurden in der frühen Reperfusionsphase untersucht.

1. Validierung der Tiermodelle

Es erfolgte die Bestimmung des Genotyps der einzelnen Mäuse mittels PCR. Abbildung 10 zeigt ein repräsentatives PCR-Gel zur Bestimmung des Genotyps. Das PCR-Produkt von Sirt4^{+/+} Mäusen zeigt eine Bande bei 600 bps, während das PCR-Produkt von Sirt4^{-/-} Mäusen eine Bande bei 400 bps aufweist. Das Vorhandensein des Sirt4 Transgens wird in der Transgen-PCR bei einer Bande bei 1900 bps nachgewiesen. Allerdings überexprimieren nur die cSirt4TG-Mäuse kardiomyozytenspezifisch Sirt4, die auch eine aktive α -MHC-Cre-Rekombinase und eine Bande bei 300 bps zeigen.

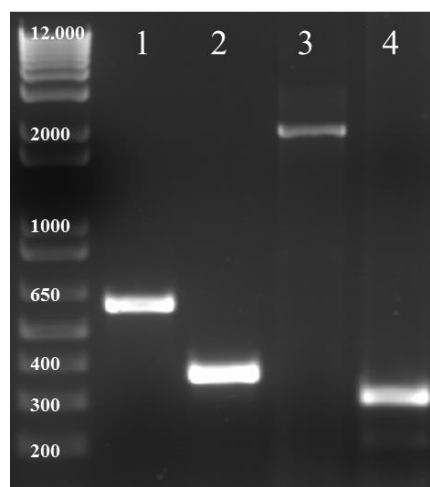


Abbildung 10: Repräsentatives PCR-Gel zur Bestimmung des Genotyps.

1) Sirt4^{+/+}; ~600 bps. 2) Sirt4^{-/-}; ~400 bps. 3) cSirt4TG-transgen; ~1900 bps. 4) cSirt4TG- α -MHC Cre; ~300 bps.

Es wurden zwei verschiedene Western Blots zur Validierung der Tiermodelle durchgeführt. Der Erste diente dem Nachweis der myokardialen Sirt4 Expression in den unterschiedlichen Tiermodellen. Hierzu erfolgte ein Western Blot für Sirt4 mit Herzmuskelhomogenat von Sirt4^{-/-}, Sirt4^{+/+}, cSirt4TG und cSirt4TG Kontroll-Mäusen. In Abbildung 11 kann man erkennen, dass die Sirt4-Bande in Herzproben von Sirt4^{-/-} Mäusen im Gegensatz zum Wildtyp (Sirt4^{+/+}) verschwunden ist. Der Vergleich von cSirt4TG und cSirt4TG-Kontrolle zeigt, dass in der cSirt4TG Maus eine deutlich stärkere Sirt4-Bande vorliegt.

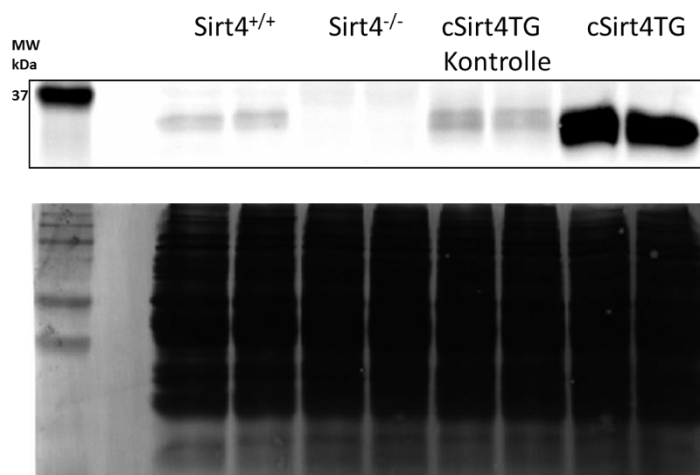


Abbildung 11: Repräsentativer Western Blot für Sirt4 in Herzhomogenaten von Sirt4^{-/-} und cSirt4TG Mäusen im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp. Sirt4 liegt bei 35 kDa.

Der zweite Western Blot diente dem Nachweis einer kardiomyozyten-spezifischen Überexpression von Sirt4. Hierzu wurde die Expression von Sirt4 in verschiedenen Geweben (Herz, Leber, Niere, Muskel) von cSirt4TG und cSirt4TG Kontroll-Mäusen verglichen. In Abbildung 12 kann man erkennen, dass in den Gewebshomogenaten von Leber, Niere und Muskel kein Unterschied in der Sirt4-Expression zwischen cSirt4TG und cSirt4TG Kontroll-Mäusen sichtbar wird. Im Herzhomogenat allerdings fällt eine deutlich intensivere Bande in der cSirt4TG-Maus im Vergleich zum Kontrolltier auf, was beweist, dass Sirt4 in der Sirt4TG-Maus nur im Herzen überexprimiert wird.

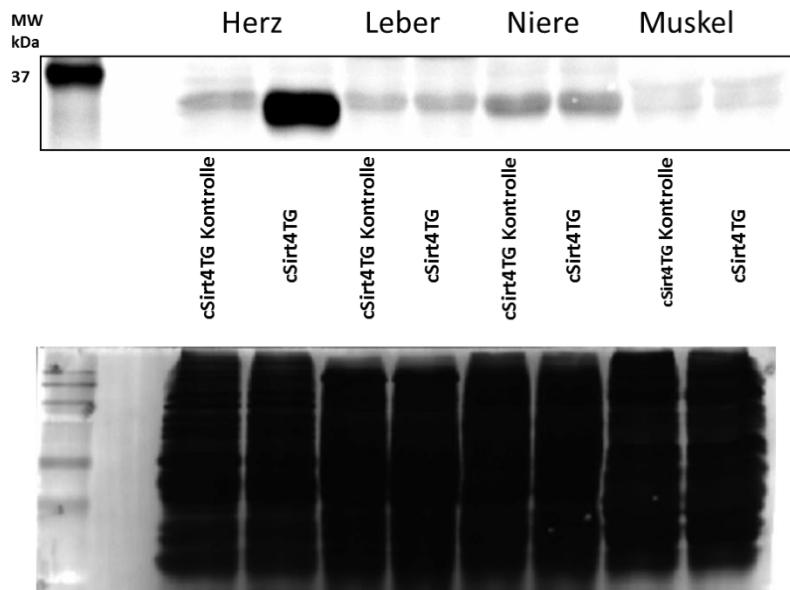


Abbildung 12: Repräsentativer Western Blot für Sirt4 in Homogenaten von Herz-, Leber-, Nieren- und Muskelgewebe von cSirt4TG und cSirt4TG Kontroll-Mäusen. Sirt4 liegt bei 35 kDa.

2. Untersuchungen in $Sirt4^{-/-}$ Mäusen

2.1. Herzgewicht, Körpergewicht und Tibiallänge in $Sirt4^{-/-}$ Mäusen

Tabelle 24 zeigt das Herzgewicht (HG), das Körpergewicht (KG), die Tibiallänge (TL), sowie das Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis (HG/KG) und das Herzgewicht-Tibiallängen-Verhältnis (HG/TL) von 8 Wochen alten $Sirt4^{-/-}$ und Wildtyp-Mäusen. Es wurden keinerlei Unterschiede in den untersuchten Parametern zwischen den zwei Gruppen festgestellt.

Tabelle 24: Herzgewicht, Körpergewicht, Tibiallänge, Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis und Herzgewicht-Tibiallängen-Verhältnis in $Sirt4^{-/-}$ und $Sirt4^{+/+}$ Mäusen im Alter von 8 Wochen.

	$Sirt4^{+/+}$	$Sirt4^{-/-}$
HG (mg)	126,2 ± 9,6	127,8 ± 15,2
KG (g)	22,1 ± 1,4	21,3 ± 1,9
TL (mm)	16,2 ± 2,2	17,0 ± 0,8
HG/KG (mg/g)	5,7 ± 0,2	6,0 ± 0,4
HG/TL (mg/mm)	8,0 ± 1,0	7,7 ± 1,1

Herzgewicht (HG), Körpergewicht (KG), Tibiallänge (TL). TL n=6, HG und KG n=10.

2.2. Kontraktile Funktion in *Sirt4*^{-/-} Mäusen

Mit der Langendorff-Perfusion kann die kontraktile Funktion eines Herzens ex vivo evaluiert werden. Abbildung 13 zeigt die kardialen kontraktile Parameter von *Sirt4*^{-/-} und Wildtyp-Mäusen im Alter von 8 Wochen im Modell der Langendorff-Perfusion. Die Herzfrequenz war in *Sirt4*^{-/-} Mäusen mit 269 bpm (beats per minute) im Vergleich zum Wildtyp mit 308 bpm niedriger. Linksventrikulär entwickelter Druck (LVdP), linksventrikuläre maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}), linksventrikuläre minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{min}), sowie das Frequenz-Druck-Produkt wiesen allerdings keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf.

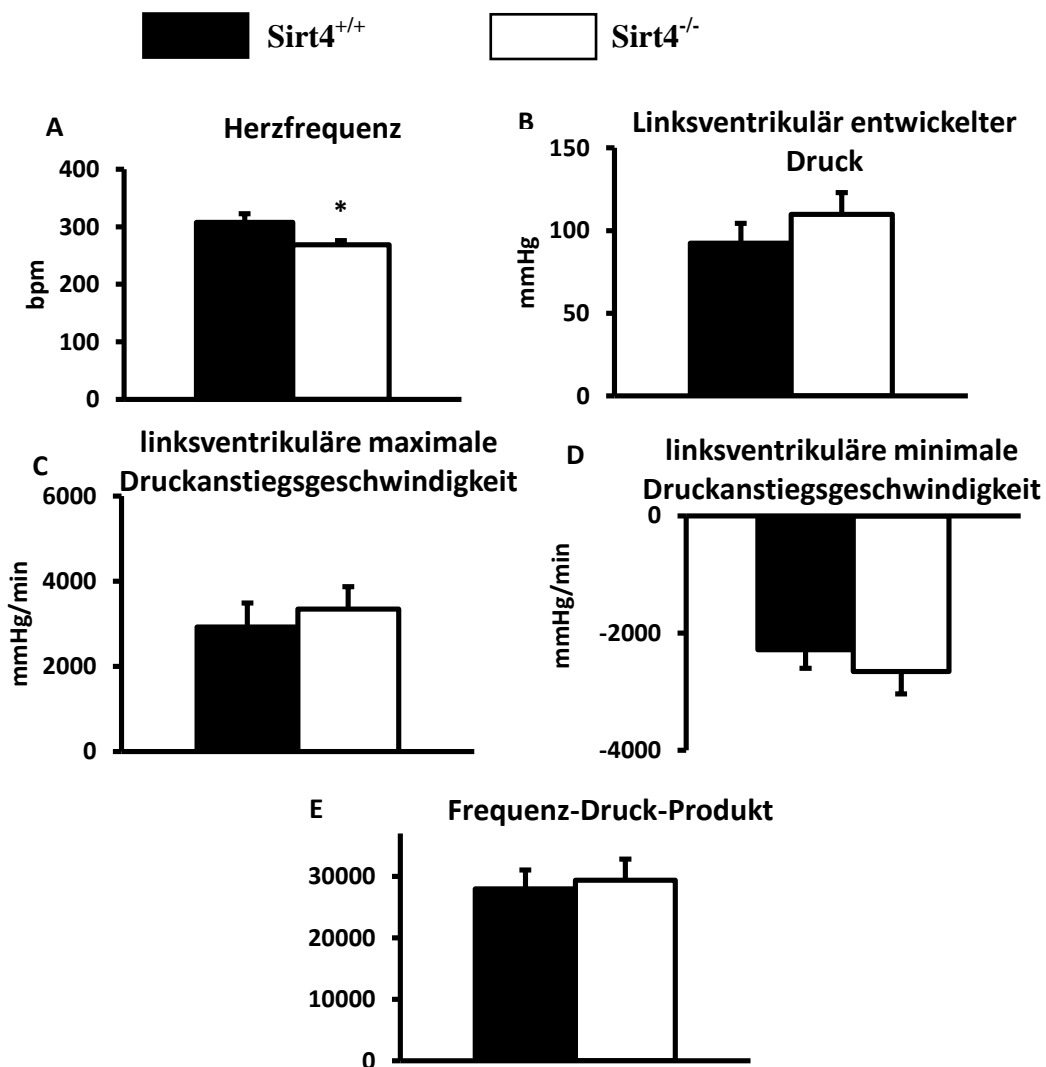


Abbildung 13: Kardiale kontraktile Funktion in der Langendorff-Perfusion in *Sirt4*^{-/-} und *Sirt4*^{+/+} Mäusen. Herzfrequenz (A), linksventrikulär entwickelter Druck (LVdP) (B), linksventrikuläre maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}) (C), linksventrikuläre minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{min}) (D) und Frequenz-Druck-Produkt (E) in Langendorff perfundierten Herzen von *Sirt4*^{-/-} und *Sirt4*^{+/+} Mäusen im Alter von 8 Wochen; n=6; * p<0,05 versus WT.

2.3. Myokardiale mitochondriale Atmungskapazität in *Sirt4*^{-/-} Mäusen

Der mitochondriale O₂-Verbrauch wurde in isolierten kardialen Mitochondrien von *Sirt4*^{-/-} und *Sirt4*^{+/+} Mäusen untersucht. Abbildung 14 zeigt den O₂-Verbrauch beider Gruppen jeweils mit den Substraten Glutamat/Malat (Abbildung 14 A) und Palmitoylcarnitin/Malat (Abbildung 14 B). State II, State III und State IV waren mit beiden Substratkombinationen jeweils nicht unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen.

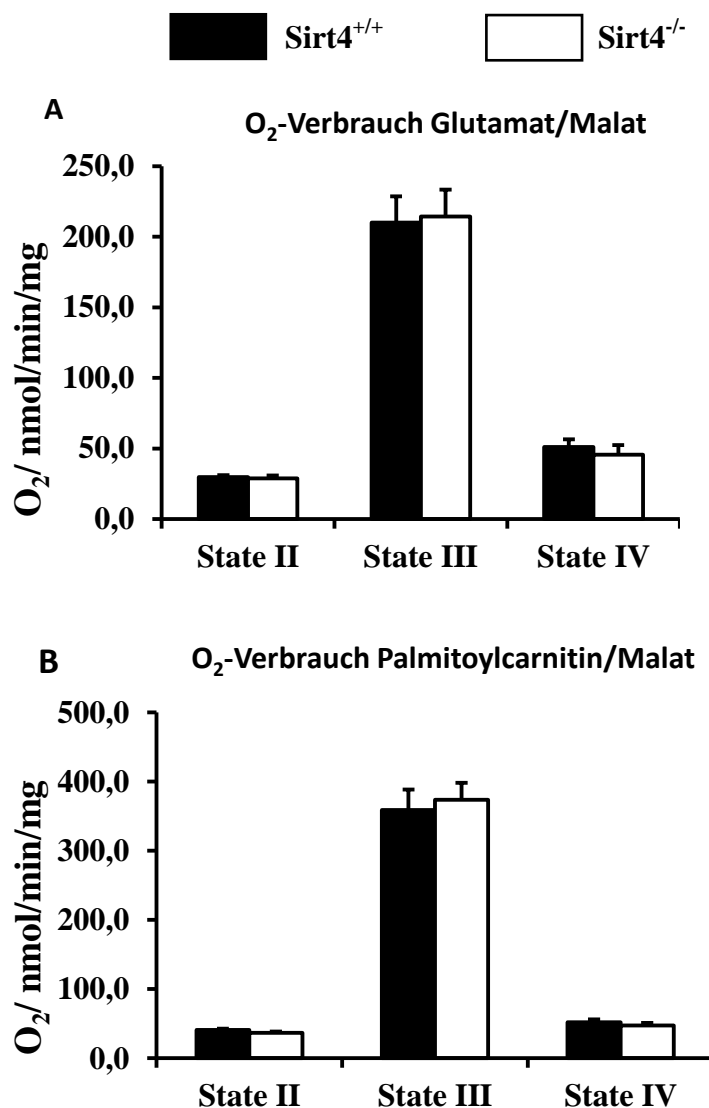


Abbildung 14: Myokardialer mitochondrialer O₂-Verbrauch. Sauerstoffverbrauch mit den Substraten Glutamat/Malat (A), sowie Palmitoylcarnitin/Malat (B), in State II, State III und State IV in isolierten kardialen Mitochondrien von *Sirt4*^{-/-} und *Sirt4*^{+/+} Mäusen. n=4-6.

2.4. Kardiale Infarktgröße nach LAD-Ligatur in *Sirt4*^{-/-} Mäusen

Die kardiale Infarktgröße wurde 24 Stunden nach einer 60-minütigen LAD-Ligatur mittels Evans Blue-TTC Färbung bestimmt. Wie in Abbildung 15 gezeigt, betrug der Anteil der Infarktgröße an der Area at Risk (AAR) in *Sirt4*^{-/-} Mäusen nur 20%, wohingegen der Anteil der Infarktgröße in *Sirt4*^{+/+} Mäusen 41% betrug. Somit war die myokardiale Infarktgröße nach LAD-Ligation in *Sirt4*^{-/-} Mäusen um über 50% kleiner als in *Sirt4*^{+/+} Mäusen.

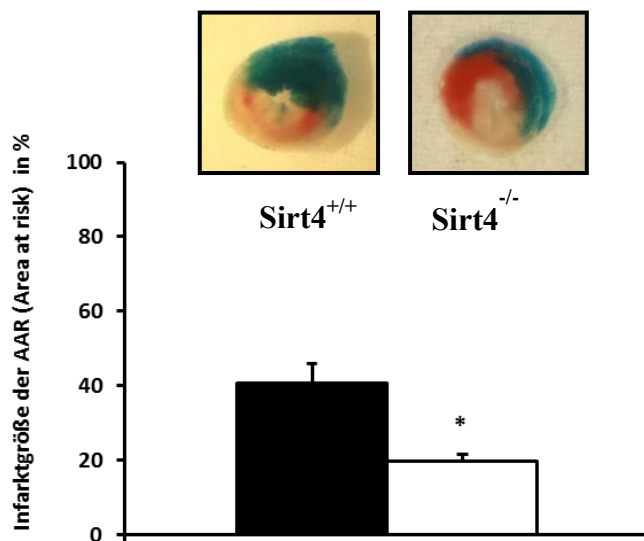
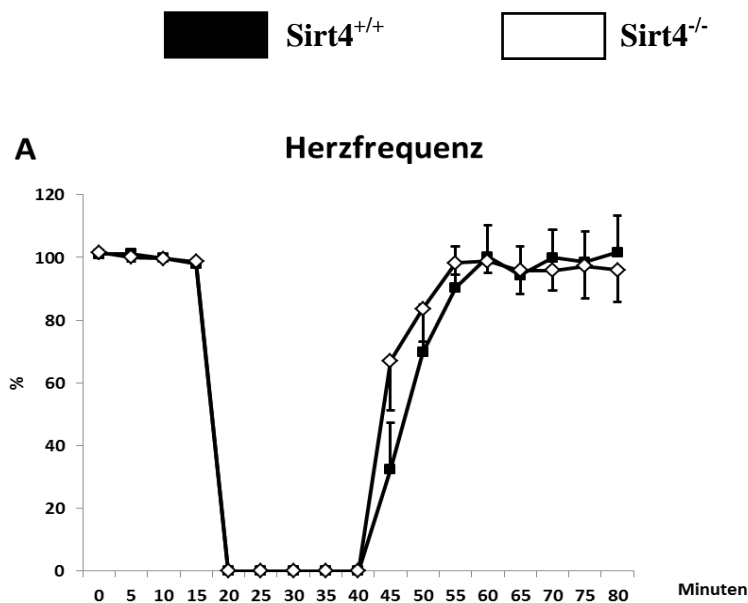


Abbildung 15: Kardiale Infarktgröße nach 60-minütiger LAD-Ligatur, bestimmt durch Evans-Blue-TTC-Staining in *Sirt4*^{-/-} und Wildtyp-Mäusen; n=6; * p<0,05 versus WT. Repräsentative Abbildungen des TTC-Stainings; Non Risk Area=blau, Area at Risk (AAR)=blau und weiß, nekrotisches Areal der AAR=weiß, vitales Areal der AAR=rot.

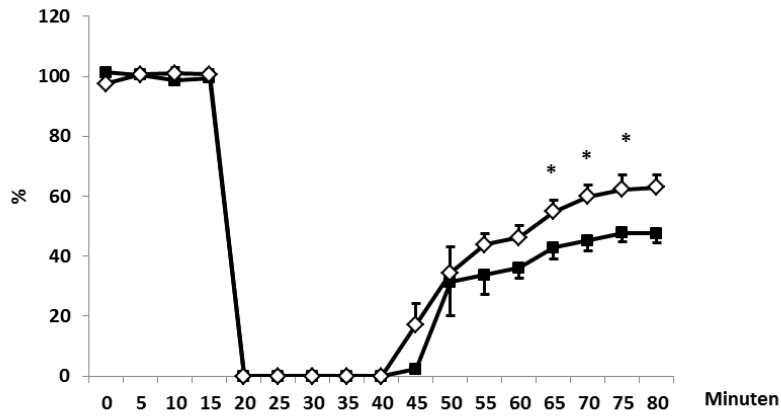
2.5. Post-ischämische Erholung der Herzfunktion in *Sirt4*^{-/-} Mäusen

Die Erholung der kardialen kontraktiven Funktion wurde anhand des Modells der Langendorff-Perfusion mittels globaler kardialer Ischämie in *Sirt4*^{-/-} und *Sirt4*^{+/+} Mäusen untersucht. Zuerst wurden die Herzen für 15 Minuten normal perfundiert, dann erfolgte eine 25-minütige Ischämie und anschließend eine 40-minütige Reperfusion. In Abbildung 16 wird jeweils die prozentuale Erholung der Herzfrequenz, des linksventrikulären Drucks, der maximalen linksventrikulären Druckerhöhungsgeschwindigkeit, der minimalen linksventrikulären Druckerhöhungsgeschwindigkeit und des Frequenz-Druck-Produktes dargestellt. Verglichen wurde hierbei mit den prä-ischämischen Mittelwerten. Der

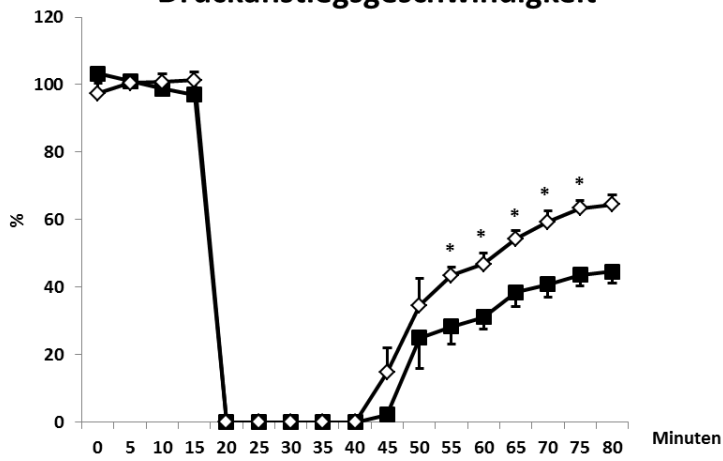
linksventrikulär entwickelte Druck erholte sich von der 25. bis zur 35. Minute der Reperfusion signifikant besser in Herzen von $Sirt4^{-/-}$ Mäusen als in Herzen von Wildtyp-Mäusen. In Minute 35. der Reperfusion waren dies beispielsweise 62% Erholung des linksventrikulär entwickelten Drucks bei Herzen von $Sirt4^{-/-}$ Mäusen, während es bei Herzen von $Sirt4^{+/+}$ Mäusen nur 48% waren. Auch die linksventrikuläre maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit erholte sich in Herzen von $Sirt4^{-/-}$ Mäusen besser (auf 43%) als in Herzen von $Sirt4^{+/+}$ Mäusen (auf 28%) ab der 15. Minute der Reperfusion. Auch die linksventrikuläre minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit und das Frequenz-Druck-Produkt zeigten höhere Mittelwerte in der Reperfusionsphase im Vergleich zum Wildtyp, wobei aber jeweils die statistische Signifikanz bei einem $n=6$ nicht erreicht wurde.



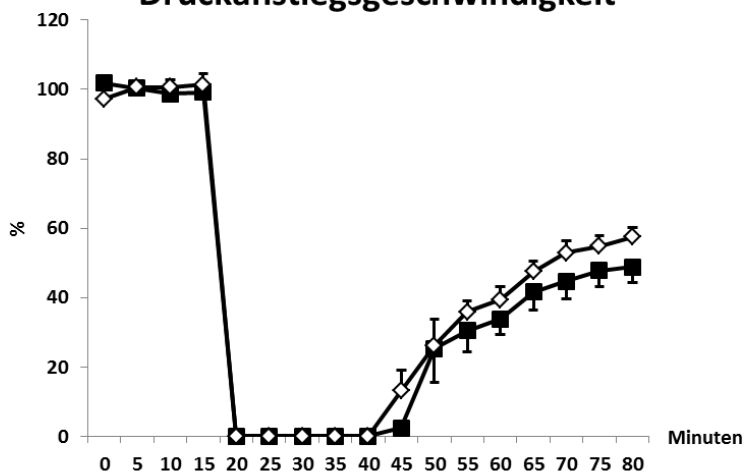
B Linksventrikulär entwickelter Druck



C Linksventrikuläre maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit



D Linksventrikuläre minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit



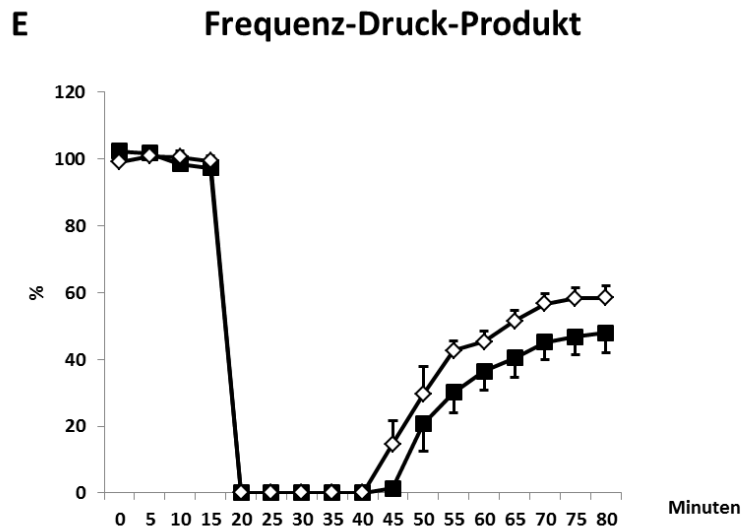


Abbildung 16: Die Erholung der kontraktile Funktion nach 25 Minuten Ischämie und 40 Minuten Reperfusion in Sirt4^{-/-} und Sirt4^{+/+} Herzen. Die prozentuale Erholung von Herzfrequenz (A), linksventrikulär entwickeltem Druck (LVdP) (B), linksventrikulär maximaler Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}) (C), linksventrikulär minimaler Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{min}) (D) und des Frequenz-Druck-Produktes (E) nach 25 Minuten Ischämie und 40 Minuten Reperfusion in Sirt4^{-/-} und Sirt4^{+/+} Herzen; n=6; * p<0,05 versus WT.

2.6. Kardiale mPTP-Öffnung in Sirt4^{-/-} Mäusen

Zahlreiche Studien konnten nachweisen, dass die vermehrte Öffnung der mPTP nach I/R in den ersten Minuten der Reperfusion am stärksten ausgeprägt ist, da es sofort nach Beginn der Reperfusion z.B. zu einem rasanten und starken Anstieg der ROS-Produktion, der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und des pH-Wertes kommt (Cohen et al. 2008; Di Lisa et al. 2001; Halestrap 1999). Die Evaluation der mPTP Öffnung erfolgte daher nach einer erneuten Langendorff-Perfusion, wobei nach 25-minütiger Ischämie aber nur eine 15-minütige Reperfusion erfolgte. Sofort wurden die kardialen Mitochondrien isoliert und der „Swelling Assay“ durchgeführt. In diesem Assay wird die Abnahme der optischen Dichte der Mitochondrien, bewirkt durch die Ca²⁺-induzierte Öffnung der mPTP während der Reperfusion, gemessen. Abbildung 17 zeigt diese Dichteabnahme bei 540nm nach Zugabe von CaCl₂. Die optische Dichte der kardialen Mitochondrien von Sirt4^{-/-} und Sirt4^{+/+} Mäusen war nicht unterschiedlich. Eine Messung in WT-Mitochondrien in der Anwesenheit des mPTP-Inhibitors Cyclosporin A (hemmt komplett die Ca²⁺-induzierte mPTP-Öffnung) diente als Kontroll-Messung.

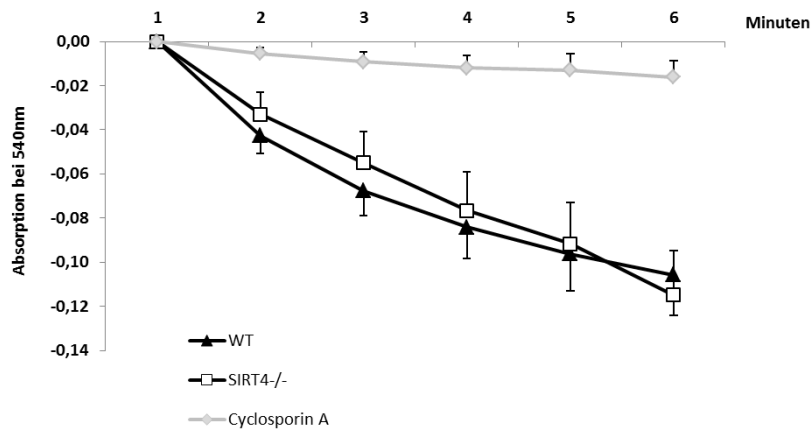


Abbildung 17: Swelling Assay in der frühen Reperfusion bei Sirt4^{-/-} und Sirt4^{+/+} Mäusen. Optische Dichte gemessen bei 540 nm nach Zugabe von CaCl₂ (Calciumchlorid) in isolierten kardialen Mitochondrien von Sirt4^{-/-} und Sirt4^{+/+} Mäusen. Der mPTP-Hemmer Cyclosporin A wurde als Negativkontrolle verwendet; n=6.

2.7. Kardiale mitochondriale H₂O₂-Bildung in Sirt4^{-/-} Mäusen

Die Produktion von mitochondrialen ROS in der frühen Reperfusion wurde mit dem Amplex Red Assay in isolierten kardialen Mitochondrien von Sirt4^{+/+} und Sirt4^{-/-} Mäusen untersucht. Hierzu erfolgte eine Langendorff-Perfusion mit I/R wie unter 2.6 beschrieben, mit nachfolgender Isolation der Herzmuskelmitochondrien und Durchführung des Amplex Red Assays. Abbildung 18 zeigt, dass Mitochondrien, die 15 Minuten nach Beginn der Reperfusion isoliert wurden, bei der Bildung von H₂O₂ keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen aufwiesen.

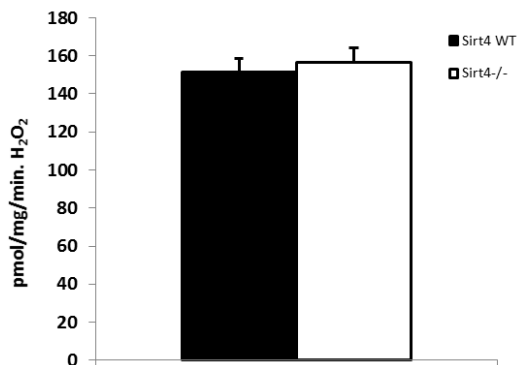


Abbildung 18: Bildung von H₂O₂ in isolierten kardialen Mitochondrien nach 25 Minuten Ischämie und 15 Minuten Reperfusion in Sirt4^{-/-} und Sirt4^{+/+}. n=6.

3. Untersuchungen in cSirt4TG Mäusen

Die Untersuchungen zur myokardialen I/R in Sirt4^{-/-} Mäusen, die in dieser Arbeit bislang vorgestellt wurden, deuten auf einen kardioprotektiven Phänotyp in Sirt4^{-/-} Mäusen hin. Es stellte sich daher die Frage, ob sich im Umkehrschluß eine Überexpression von Sirt4 entsprechend negativ auf den I/R-Schaden auswirken würde. Daher wurden in den folgenden Experimenten cSirt4TG-Mäuse, welche kardiomyozytenspezifisch Sirt4 vermehrt exprimieren, mit cSirt4TG Kontroll-Mäusen verglichen.

3.1. Herzgewicht, Körpergewicht und Tibialänge in cSirt4TG Mäusen

In Tabelle 25 werden Herzgewicht (HG), Körpergewicht (KG), Tibialänge (TL), Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis (HG/KG) und Herzgewicht-Tibialängen-Verhältnis (HG/TL) von cSirt4TG und cSirt4TG Kontroll-Tieren verglichen. Hierbei konnten keinerlei Unterschiede in den untersuchten Parametern zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

Tabelle 25: Herzgewicht, Körpergewicht, Tibialänge, Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis und Herzgewicht-Tibialängen-Verhältnis in cSirt4TG und cSirt4TG Kontroll-Mäusen im Alter von 8 Wochen.

	cSirt4TG Kontrolle	cSirt4TG
HG (mg)	123,4 ± 12,3	125,6 ± 14,3
KG (g)	28,7 ± 1,9	28,3 ± 2,8
TL (mm)	18,0 ± 0,5	18,0 ± 0,6
HG/KG (mg/g)	4,3 ± 0,2	4,5 ± 0,3
HG/TL (mg/mm)	6,9 ± 0,7	7,1 ± 0,7

Herzgewicht (HG), Körpergewicht (KG), Tibialänge (TL). n=8-10

3.2. Kontraktile Funktion in cSirt4TG Mäusen

Auch in cSirt4TG Mäusen wurde die kontraktile Funktion des Herzens ex-vivo mittels Langendorff-Perfusion untersucht. In Abbildung 19 werden die kontraktile Parameter von 8 Wochen alten cSirt4TG sowie cSirt4TG Kontroll-Mäusen dargestellt. Weder in der Herzfrequenz, dem linksventrikulär

entwickeltem Druck, der linksventrikulär maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit, der linksventrikulär minimalen Druckanstiegsgeschwindigkeit, noch im Frequenz-Druck-Produkt konnten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gefunden werden.

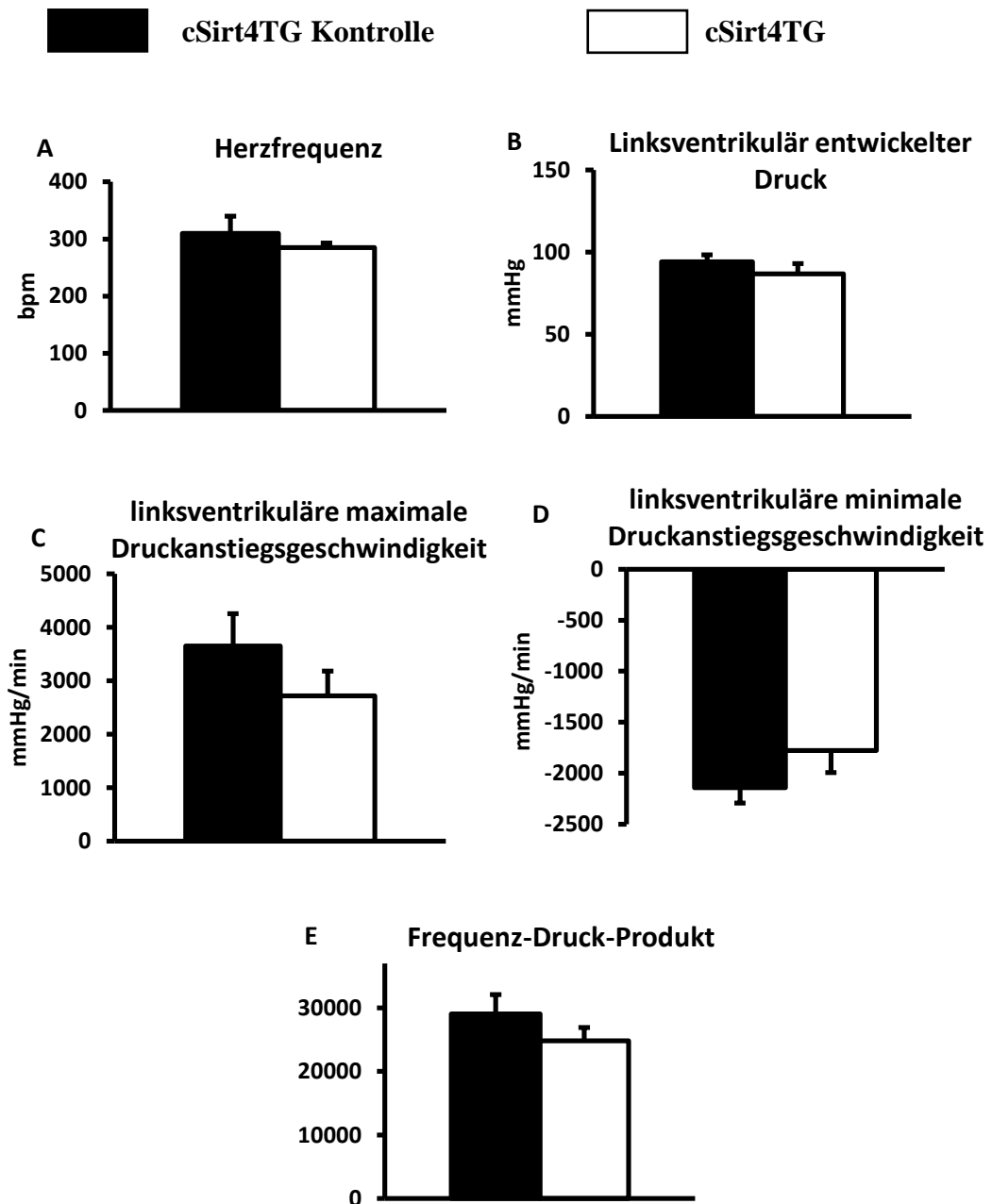


Abbildung 19: Kardiale kontraktile Funktion in der Langendorff-Perfusion in cSirt4TG und cSirt4TG Kontroll-Mäusen. Herzfrequenz (A), linksventrikulär entwickelter Druck (LVdP) (B), linksventrikuläre maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}) (C), linksventrikuläre minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{min}) (D) und Frequenz-Druck-Produkt (E) in Langendorff perfundierten Herzen von cSirt4TG und cSirt4TG-Kontroll-Mäusen im Alter von 8 Wochen; n=4.

3.3. Kardiale Infarktgröße nach LAD-Ligatur in cSirt4TG Mäusen

Die kardiale Infarktgröße wurde 24 Stunden nach einer 30-minütigen LAD-Ligatur mittels Evans Blue-TTC Färbung bestimmt. Wie in Abbildung 20 gezeigt, konnte keinerlei Unterschied in der Infarktgröße zwischen cSirt4TG und cSirt4TG Kontroll-Mäusen festgestellt werden.

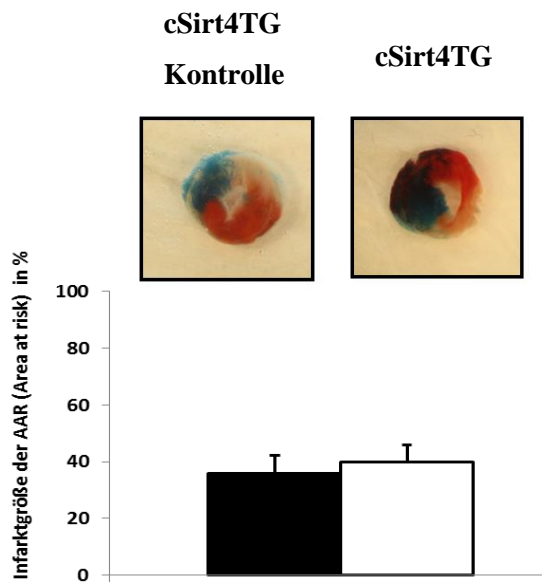


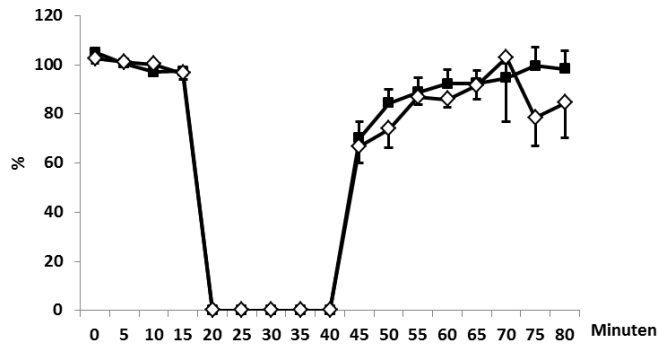
Abbildung 20: Kardiale Infarktgröße nach 60-minütiger LAD-Ligatur, bestimmt durch Evans-Blue-TTC-Staining in cSirt4TG und cSirt4TG Kontroll-Mäusen; n=6. Repräsentative Abbildungen des TTC-Stainings; Non Risk Area=blau, Area at Risk (AAR)= blau und weiß, nekrotisches Areal der AAR= weiß, vitales Areal der AAR= rot.

3.4. Post-ischämische Erholung der Herzfunktion in cSirt4TG Mäusen

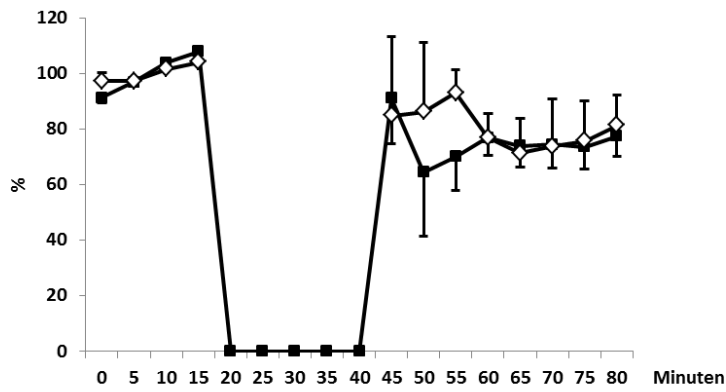
Um die Erholung der kontraktiven Funktion nach einer Ischämie ex vivo zu untersuchen, wurde im Modell der Langendorff-Perfusion eine globale Ischämie für 25 Minuten herbeigeführt, gefolgt von einer 40-minütigen Reperfusion. In Abbildung 21 ist die prozentuale Erholung der kardialen kontraktiven Funktion nach Ischämie in cSirt4TG und cSirt4TG Kontroll-Mäusen dargestellt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt werden.



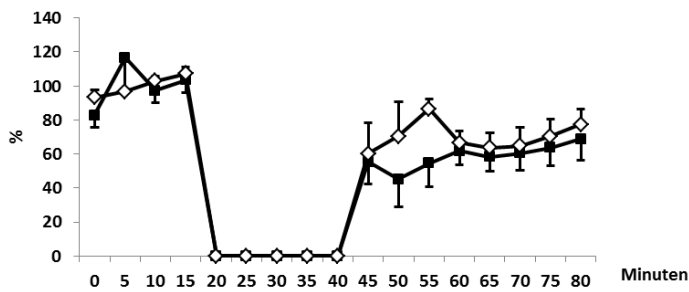
A Herzfrequenz



B Linksventrikulär entwickelter Druck



C Linksventrikuläre maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit



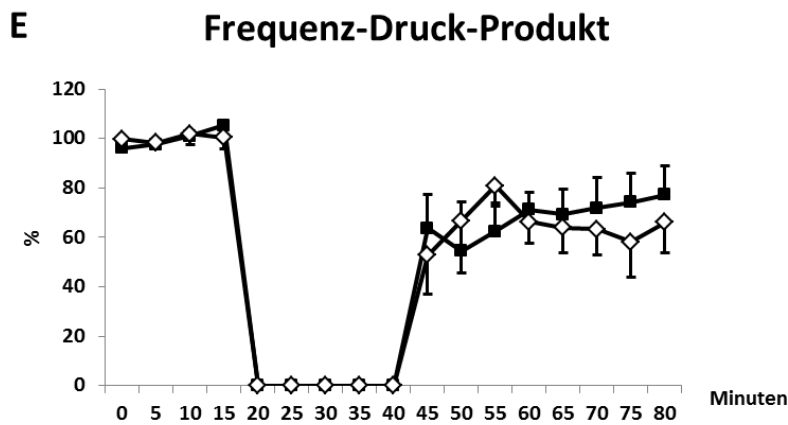
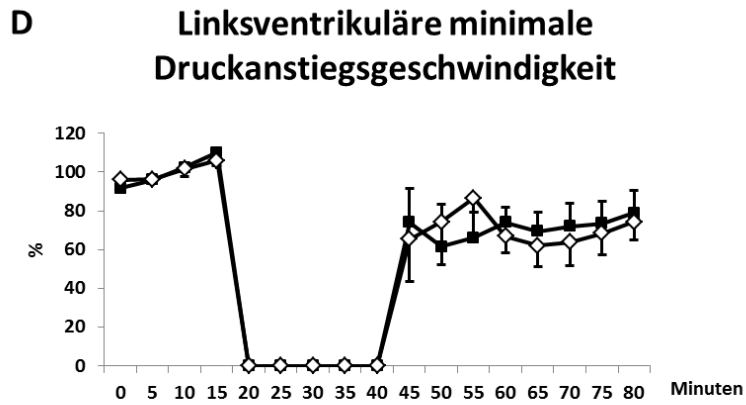


Abbildung 21: Die Erholung der kontraktile Funktion nach 25 Minuten Ischämie und 40 Minuten Reperfusion in cSirt4TG und cSirt4TG Kontroll-Herzen. Die prozentuale Erholung von Herzfrequenz (A), linksventrikulär entwickeltem Druck (LVdP) (B), linksventrikulär maximaler Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}) (C), linksventrikulär minimaler Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{min}) (D) und des Frequenz-Druck-Produktes (E) nach 25 Minuten Ischämie und 40 Minuten Reperfusion in cSirt4TG und cSirt4TG Kontroll-Herzen; n=6.

V. DISKUSSION

Der Herzinfarkt stellt eine der häufigsten Todesursachen weltweit dar (Keeley et al. 2003). Die Folgen nach einem Infarkt hängen von der Infarktgröße ab, welche während der Ischämie sowie der darauffolgenden Reperfusion des entsprechenden Gewebes entsteht (Murphy und Steenbergen 2008). Verschiedene mitochondriale Fehlfunktionen, insbesondere die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen oder die vermehrte Öffnung der mPTP im Rahmen der I/R, bestimmen die Größe des I/R Schadens (Zweier und Talukder 2006; Di Lisa et al. 2011). Studien legen nahe, dass die bislang wenig untersuchte NAD⁺-abhängige Deacetylase Sirt4 über ihr Target Cyclophilin D die Öffnung der mPTP induzieren könnte und damit an der Ausbildung des myokardialen I/R-Schadens beteiligt sein könnte (Verma et al. 2013). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die Rolle von Sirt4 in der Ausbildung des kardialen I/R-Schadens zu definieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Infarktgröße nach vorübergehender LAD-Ligation in Sirt4^{-/-} Mäusen deutlich geringer ist als in entsprechend behandelten WT-Mäusen, und dass die Erholung der Herzfunktion nach globaler Ischämie und Reperfusion im Langendorff-Modell in Sirt4^{-/-} Mäusen besser ist als in WT-Mäusen. Mäuse mit Überexpression von Sirt4 zeigen jedoch keinen Unterschied in der Infarktgröße oder postischämischen Erholung der Herzfunktion im Vergleich zu WT-Mäusen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das Fehlen von Sirt4 kardioprotektiv ist, eine Überexpression von Sirt4 sich hingegen jedoch nicht zellschädigend auswirkt. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert und in Kontext mit anderen Studien gestellt werden.

Zur Beurteilung des Einflusses von Sirt4 auf den I/R-Schaden ist zunächst die Rolle von Sirt4 im Herzmuskel näher zu definieren. Daher wurde zuerst die kardiale kontraktile Funktion *ex vivo* im Langendorff-Modell in 8 Wochen alten Mäusen untersucht. Sowohl in Sirt4^{-/-} als auch in cSirt4TG Mäusen waren der linksventrikulär entwickelte Druck (LVdP), die maximale linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}), die minimale linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dp/dt_{min}) und das Frequenz-Druck-Produkt nicht unterschiedlich zur entsprechenden WT-Gruppe. Insofern scheint sowohl Fehlen als auch Überexpression die kontraktile Funktion unter physiologischen

Bedingungen nicht merklich zu beeinflussen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Daten von Luo et al., die mittels Echokardiographie weder in Sirt4^{-/-} Mäusen noch in Mäusen mit kardiomyozyten-spezifischer Überexpression von Sirt4 eine Abnahme der Ejektionsfraktion im Vergleich zum WT nachweisen konnten (Luo et al. 2016). Interessanterweise zeigte sich in dieser Studie jedoch, dass die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie infolge chronischer Erhöhung der kardialen Arbeitslast durch 4-wöchige Applikation von Angiotensin II in Sirt4^{-/-} Herzen verhindert wurde. In Sirt4-überexprimierenden Mäusen hingegen war die Hypertrophie nach der Behandlung stärker ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Sirt4 die Entschärfung mitochondrialer O₂-Radikale durch Hemmung der mitochondrialen Superoxiddismutase (Mangan Superoxiddismutase, MnSOD) vermindert und somit durch oxidativen Stress die Ausbildung der kardialen Hypertrophie in Sirt4 überexprimierenden Mäusen ausgelöst haben könnte. Passend zu dieser Hypothese konnte auch gezeigt werden, dass eine Behandlung dieser Mäuse mit dem Mitochondrien-spezifischen Radikalfänger MnTBAP (Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin) die Ausbildung einer exazerbierten kardialen Hypertrophie in Sirt4 überexprimierenden Mäusen verhindern konnte. Zusammengefasst scheint Sirt4 somit unter physiologischen Bedingungen für die Erhaltung der Herzfunktion entbehrlich zu sein. Werden jedoch die Energieanforderungen an das Herz erhöht, wirkt das Fehlen von Sirt4 der Entwicklung einer Hypertrophie entgegen und vermittelt somit einen kardioprotektiven Effekt. Dieser kardioprotektive Effekt könnte die Folge einer abgeschwächten mitochondrialen ROS-Produktion sein, wenn durch Fehlen von Sirt4 die hemmende Wirkung auf die MnSOD wegfällt. Tatsächlich tragen ROS durch direkte Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden in den Mitochondrien wesentlich zur Ausbildung einer kardialen Hypertrophie bei (Rosca et al. 2013).

Ein deutlicher kardioprotektiver Effekt zeigte sich auch nach myokardialer Ischämie-Reperfusion in Sirt4^{-/-} Mäusen. Nach transientser LAD-Ligation war die myokardiale Infarktgrösse um mehr als 50% reduziert, und die Erholung der kontraktile Funktion nach Ischämie im Langendorff-Modell war in Sirt4^{-/-} Mäusen besser als in WT-Mäusen. Dieser protektive Effekt wird hier erstmalig beschrieben, bislang liegen in der Literatur keine Untersuchungen zum Einfluss

von Sirt4 in der myokardialen I/R vor. Da es während einer myokardialen Ischämie, aber auch während der Reperfusion zu einem deutlichen Verlust an mitochondrialem NAD^+ kommt, dürfte die Aktivität der NAD^+ -abhängigen Deacetylase Sirt4 während I/R grundsätzlich vermindert sein (Di Lisa et al. 2001). Somit könnte man den protektiven Effekt in $\text{Sirt4}^{-/-}$ Mäusen so interpretieren, dass eine Abnahme der Sirt4-Aktivität während I/R als endogener protektiver Mechanismus funktioniert, der einer größeren Schädigung durch I/R entgegenwirkt. Ähnliche kardioprotektive Signalwege im Rahmen der I/R wurden bereits identifiziert und unterstützen solch eine Hypothese endogener protektiver Mechanismen. Zum Beispiel moduliert der Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK) Signalweg die Öffnung der mPTP durch Aktivierung der PI3K/AKT (Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B) Achse und/oder durch Aktivierung der MEK/ERK (Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinases) -Signalkaskade (Cross et al. 2000; Yellon und Baxter 1999; Hausenloy und Yellon 2004; Baxter et al. 2001). Weiter wird die mPTP Funktion im Rahmen der I/R durch den Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) Signalweg reguliert, der durch $\text{TNF}\alpha$ (Tumornekrosefaktor α) -vermittelte Aktivierung des JAK/STAT3 (Januskinase/Signal Transducers and Activators of Transcription) -Signalweges protektive Effekte in der I/R entfaltet (Lecour 2009; Lecour et al. 2002; Dawn et al. 2004; Smith et al. 2004). Ob Sirt4 Teil dieser Signalwege sein könnte, ist bislang nicht untersucht.

Zur Klärung des Mechanismus, über welchen Sirt4 während I/R protektiv wirkt, wurden die mitochondriale H_2O_2 Produktion sowie die Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP 15min nach Beginn der Reperfusion evaluiert. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da mehrere Studien zeigen konnten, dass nach 15min Reperusionszeit die erhöhte ROS Produktion und mPTP Öffnung gut nachgewiesen werden können (Halestrap et al. 2004; Javadov et al. 2003; Kerr et al. 1999). Zu diesem Zeitpunkt waren allerdings sowohl die ROS Produktion als auch die mPTP Öffnung nicht unterschiedlich zwischen $\text{Sirt4}^{-/-}$ und WT Mäusen. In weiteren Experimenten, die nach Abschluß dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigte sich jedoch, dass die mitochondriale ROS-Produktion 2min nach Beginn der Reperfusion in $\text{Sirt4}^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen deutlich niedriger ist. Auch die mPTP öffnete sich geringfügig weniger in $\text{Sirt4}^{-/-}$ Mäusen, allerdings

war die prozentuale Abnahme deutlich geringer ausgeprägt als die Abnahme der ROS Produktion. Zum aktuellen Zeitpunkt kann daher am ehesten davon ausgegangen werden, dass der protektive Effekt einer verminderten mitochondrialen ROS-Produktion zugeschrieben werden kann, wahrscheinlich durch Entthemmung der MnSOD-Aktivität unter Sirt4-Defizienz. Hier wird vermutet, dass das Fehlen von Sirt4 die Interaktion von Sirt3 mit der MnSOD verbessert. Sirt3 würde dann durch Deacetylierung der MnSOD die MnSOD-Aktivität steigern und die Radikalentschärfung verbessern.

Ein weiterer Mechanismus, der die postischämische Erholung der Herzfunktion verbessern könnte, ist eine bessere Erholung des mitochondrialen oxidativen Energiesubstratstoffwechsels. Während der Ischämie erfolgt zu Beginn aufgrund von O₂-Depletion eine Umstellung der kardialen ATP-Produktion auf anaerobe Glykolyse, bis auch diese nach wenigen Minuten zum Stehen kommt. Zu Beginn der Reperfusion ist O₂ wieder in ausreichendem Maße verfügbar, so dass sofort wieder auf oxidativen Stoffwechsel zur ATP Produktion umgeschaltet wird (Schmidt et al. 2011). Sirt4 reguliert wesentliche Stoffwechselwege der kardialen ATP Produktion. Sirt4 hemmt die Anaplerose des Citratzyklus durch ADP Ribosylierung und damit Hemmung der Glutamatdehydrogenase 1 (Haigis und Guarente 2006; Ahuja et al. 2007). Sirt4 deacetyliert und hemmt damit die Malonyl-CoA Decarboxylase, was durch einen Anstieg der Malonyl-Coa Spiegel zu einer Hemmung der CPT1-Aktivität und damit der Fettsäureoxidation führt (Laurent et al. 2013). Sirt4 hydrolysiert letztlich auch Lipoamid-Kofaktoren des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes und hemmt damit dessen Aktivität und damit die Oxidation von Glukose in den Mitochondrien (Mathias et al. 2014). Somit hemmt Sirt4 die entscheidenden Stoffwechselwege der kardialen ATP Produktion. Umgekehrt kann bei Fehlen von Sirt4 von einer Aktivierung dieser Stoffwechselwege ausgegangen werden. Entsprechend konnten Haigis und Kollegen zeigen, dass die Suppression von Sirt4 mittels siRNA zu einem Anstieg der Fettsäureoxidation in Skelettmuskel und Lebergewebe führt (Haigis et al. 2006). Ebenso zeigen vorläufige Daten aus unserer Arbeitsgruppe, dass die Oxidation von Fettsäuren im Herzmuskel in Sirt4^{-/-} Mäusen deutlich (<50%) erhöht ist. Basierend auf diesen Ergebnissen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass eine verminderte Aktivität von Sirt4 während einer myokardialen

I/R eine raschere Erholung des oxidativen Stoffwechsels und der ATP Produktion begünstigen könnte, was eine bessere Erholung der kontraktile Funktion zur Folge hätte.

Die Regulation der Ischämietoleranz durch mitochondriale Sirtuine ist nicht neu. In den vergangenen Jahren wurden ähnliche Studien auch in Mäusen mit Sirt3-Defizienz und Sirt5-Defizienz publiziert. Sirt3^{-/-} Mäuse weisen nach I/R im Langendorff-System einen größeren Infarkt als in WT-Mäusen auf (Porter et al. 2014), und Sirt5^{-/-} Mäuse weisen nach I/R eine schlechtere Erholung der Herzfunktion auf (Boylston et al. 2015). Es scheint somit, dass sämtliche mitochondrialen Sirtuine (Sirt3-5) an der Regulation des I/R-Schadens beteiligt sind, wobei Fehlen von Sirt3 und Sirt5 den I/R-Schaden amplifiziert, Fehlen von Sirt4 jedoch protektiv zu sein scheint. Es ist daher davon auszugehen, dass die 3 mitochondrialen Sirtuine ein sich ergänzendes Regulationssystem darstellen, mit welchem eine Feineinstellung der Mitochondrienfunktion erfolgen kann, die insbesondere unter pathologischen Bedingungen wie I/R relevant sein dürfte. Unklar bleibt bei dieser Hypothese allerdings, wie die 3 Sirtuine während I/R reguliert werden, da eine NAD⁺-Depletion letztlich die Aktivität aller 3 Sirtuine hemmen könnte. Weitere Studien sollten klären, inwiefern der Mangel an NAD⁺ die einzelnen Enzymaktivitäten der 3 mitochondrialen Sirtuine beeinflusst und ob NAD⁺-unabhängige Regulationsmechanismen der mitochondrialen Sirtuine existieren.

Während Fehlen von Sirt4 nach I/R kardioprotektiv war, war eine Überexpression von Sirt4 allerdings im Umkehrschluß nicht schädlich. Die Erholung der kontraktile Parameter in der Langendorff-Perfusion (linksventrikulär entwickelter Druck, dp/dt, Frequenz-Druck-Produkt) waren nicht unterschiedlich im Vergleich zum WT. Es ist denkbar, dass auch bei erhöhten Sirt4-Spiegeln sowohl unter physiologischen als auch I/R Bedingungen nicht ausreichend NAD⁺ vorliegt, um die Aktivität des gesamten Sirt4-Pools zu steigern. Daher könnte der Effekt einer Sirt4-Überexpression unterschätzt werden. Experimentell könnte diese Hypothese getestet werden, indem die Sirt4-überexprimierenden Tiere mit exogen zugeführtem NAD⁺ behandelt werden. Dies ist z.B. mittels Nikotinamidmononukleotid möglich (NMN). NMN wird leicht in die Zelle

aufgenommen, als Vorstufenmolekül in den endogenen Wiederverwertungsstoffwechselweg von NAD^+ (= NAD^+ Salvage Pathway) aufgenommen und in NAD^+ umgewandelt. Der Erfolg einer solchen Behandlungsstrategie zur NAD^+ -Erhöhung und Steigerung der Sirtuin-Aktivität wurde auch im Herzen bereits für Sirt3 nachgewiesen (Karamanlidis et al. 2013). Gegen die Hypothese eines relativen NAD^+ -Mangels spricht die Beobachtung von Luo und Kollegen (2016), die in Mäusen mit Überexpression auch ohne zusätzlich Verabreichung von NAD^+ eine stärkere Ausbildung einer kardialen Hypertrophie beobachtet haben.

Unabhängig vom Wirkmechanismus einer Sirt4-Defizienz im Rahmen einer myokardialen I/R kann eine Hemmung von Sirt4 als möglicher therapeutischer Ansatz in Betracht gezogen werden. Eine 50%-ige Reduktion der Infarktgröße ist ein deutlicher Effekt, der für sich selbst spricht. Es ist vorstellbar, dass ein Sirt4 Inhibitor bei Patienten mit akutem Herzinfarkt während der Rekanalisation im Herzkatheterlabor intracoronar verabreicht werden könnte. Klinische Studien mit entsprechendem Versuchsansatz wurden beispielsweise für Inhibitoren der mPTP und ROS-Produktion bereits durchgeführt, z.B. für MTP-131 (Gibson et al. 2016; Chen et al. 2011; Sloan et al. 2012) oder Bendavia (SS-31) (Brown et al. 2014; Hou et al. 2016). Allerdings ist die Entwicklung eines Sirt4-Inhibitors problematisch. Zum einen scheint die Entwicklung eines spezifischen Sirt4-Inhibitors technisch schwierig und ist Substrat intensiver Forschung. Gerade aber bei Sirtuin-Inhibitoren ist die Spezifität entscheidend, um nicht negative Effekte durch eine zusätzliche Hemmung von Sirt3 oder Sirt5 zu bewirken. Zum anderen muss die Diffusion eines solchen Moleküls in die Mitochondrien gewährleistet werden, wo Sirt4 vorwiegend lokalisiert ist. Die Passage der Doppelmembran stellt hierbei eine Herausforderung dar. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu bewältigen, wäre eine Kopplung des Inhibitors an ein lipophiles Molekül, z.B. Tetraphenylphosphonium (TPP). Dies wurde bereits mit Erfolg für andere Moleküle exerziert, die sich in der Folge um ein Vielfaches mehr intramitochondrial angereichert haben (z.B. MitoQ) (Sioufi et al. 1983; Murphy 2008; Dare et al. 2015).

Sollten diese technischen Hürden überwunden werden, könnte die pharmakologische Hemmung von Sirt4 ein vielversprechender Therapieansatz zur Eindämmung des myokardialen I/R-Schadens darstellen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Sirtuin 4 (Sirt4) ist ein NAD^+ (oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid)-abhängiges mitochondriales Enzym, welches als Deacetylase, Lipoamidase und ADP (Adenosindiphosphat)-Ribosyltransferase unterschiedliche Zielproteine posttranslational modifiziert und damit deren Funktion reguliert. Ein Target von Sirt4 ist Cyclophilin D, das ein notwendiger Bestandteil der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) ist. Die Öffnung der mPTP kann zur Schwellung und Ruptur von Mitochondrien mit nachfolgendem Zelltod führen und spielt eine wichtige Rolle in der Ausbildung des myokardialen Ischämie-Reperfusion (I/R)-Schadens. Die Rolle von Sirt4 im Herzen ist allerdings weitgehend unbekannt. Es war das Ziel dieser Arbeit, die Rolle von Sirt4 in der Ausbildung des kardialen I/R-Schadens unter Verwendung von Mäusen mit globaler Deletion von Sirt4 ($\text{Sirt4}^{-/-}$) oder kardiomyozyten-spezifischer Überexpression von Sirt4 (cSirt4TG) zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die myokardiale Infarktgröße nach transienter LAD (left anterior descending artery)-Ligatur in $\text{Sirt4}^{-/-}$ Mäusen um über 50% kleiner war als in Wildtyp (WT)-Mäusen. Außerdem war die Erholung der kontraktilen Funktion nach I/R in der Langendorff-Herzperfusion, gemessen anhand des linksventrikulär entwickelten Drucks und der linksventrikulären maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit, besser in $\text{Sirt4}^{-/-}$ Mäusen als in WT-Mäusen. Überraschenderweise war die myokardiale mitochondriale Wasserstoffperoxid (H_2O_2)-Produktion 15 Minuten nach Beginn der Reperfusion in $\text{Sirt4}^{-/-}$ Mäusen nicht reduziert und die Calcium (Ca^{2+})-induzierte Mitochondrienschwellung als Indikator der mPTP-Öffnung ebenfalls nicht unterschiedlich. In cSirt4TG-Mäusen zeigten sich im Vergleich zum WT nach transienter LAD-Ligatur keine Unterschiede in der myokardialen Infarktgröße, und die Erholung der Kontraktilität nach I/R in der Langendorff-Perfusion war ebenfalls nicht unterschiedlich zwischen den Gruppen. Diese Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass Fehlen von Sirt4 im Rahmen der I/R kardioprotektiv wirkt und daher eine mitochondriale NAD^+ -Depletion während der myokardialen I/R durch Funktionshemmung des endogenen Sirt4 der Ausbildung eines I/R-Schadens entgegensteuert. Umgekehrt wirkt sich eine Überexpression von Sirt4 nicht nachteilig auf den I/R-Schaden aus.

VII. SUMMARY

Sirtuin 4 (Sirt4) is an NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide)-dependent enzyme that acts as deacetylase, lipoamidase as well as ADP (adenosine diphosphate)-ribosyltransferase of proteins, thus serving as a major regulator of posttranslational protein modifications. One target of Sirt4 is cyclophilin D that is a part of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP). Opening of the mPTP can result in swelling and damage of mitochondria ultimately leading to cell death. Therefore, it plays an important role in the development of myocardial ischemia reperfusion (I/R) damage. However, the role of Sirt4 in the heart is poorly defined. Therefore, the aim of this thesis was to characterize the role of Sirt4 in myocardial I/R injury. Mice lacking Sirt4 (Sirt4^{-/-}) or with cardiomyocyte restricted overexpression of Sirt4 (cSirt4TG) were investigated. Following transient ligation of the left anterior descending (LAD) coronary artery in vivo, myocardial infarct size was reduced by more than 50% in Sirt4^{-/-} mice compared to wild type (WT) mice. Furthermore, ex vivo heart perfusions in the Langendorff mode revealed improved recovery of left ventricular developed pressure and left ventricular maximum rate of pressure rise (dp/dt_{max}) following ischemia in Sirt4^{-/-} mice compared to WT mice. Interestingly, mitochondrial hydrogen peroxide (H₂O₂) production and opening of the mPTP were unchanged 15 minutes following reperfusion. In contrast to Sirt4^{-/-} mice, myocardial infarct size following transient LAD ligation and recovery of contractile function following I/R in the Langendorff perfusion were not different in cSirt4TG mice compared to WT mice. These results show that lack of Sirt4 protects the heart from I/R injury and suggest that impaired Sirt4 activity due to NAD⁺ depletion during I/R may counteract the development of I/R injury in the heart. In contrast, overexpression of Sirt4 does not increase I/R injury in the heart.

VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Energiesubstratstoffwechsels im Herzen	4
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der Atmungskette.....	6
Abbildung 3: Einfluss von AMPK auf den Energiestoffwechsel.	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung von PGC-1 α und seinen Interaktionspartnern.	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung der mPTP.....	15
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Herzens und der CoronargefäÙe bei der LAD-Ligatur	37
Abbildung 7: Kanüliertes Herz nach der Färbung mit Evans Blue.....	39
Abbildung 8: Aufbau des Herzperfusionssystems..	40
Abbildung 9: Herzkammer mit kanüliertem Herz und Ballon im linken Ventrikel, der zur Druckmessung dient.....	41
Abbildung 10: Repräsentatives PCR-Gel zur Bestimmung des Genotyps.	46
Abbildung 11: Repräsentativer Western Blot für Sirt4 in Herzhomogenaten von Sirt4 ^{-/-} und cSirt4TG Mäusen im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp.	47
Abbildung 12: Repräsentativer Western Blot für Sirt4 in Homogenaten von Herz-, Leber-, Nieren- und Muskelgewebe von cSirt4TG und cSirt4TG Kontrollmäusen	48
Abbildung 13: Kardiale kontraktile Funktion in der Langendorff-Perfusion in Sirt4 ^{-/-} und Sirt4 ^{+/+} Mäusen.....	49
Abbildung 14: Myokardialer mitochondrialer O ₂ -Verbrauch.....	50
Abbildung 15: Kardiale InfarktgröÙe nach 60-minütiger LAD-Ligatur, bestimmt durch Evans-Blue-TTC-Staining in Sirt4 ^{-/-} und Wildtyp-Mäusen.....	51
Abbildung 16: Die Erholung der kontraktilen Funktion nach 25 Minuten Ischämie und 40 Minuten Reperfusion in Sirt4 ^{-/-} und Sirt4 ^{+/+} Herzen	54

Abbildung 17: Swelling Assay in der frühen Reperfusion bei Sirt4 ^{-/-} und Sirt4 ^{+/+} Mäusen.....	55
Abbildung 18: Bildung von H ₂ O ₂ in isolierten kardialen Mitochondrien nach 25 Minuten Ischämie und 15 Minuten Reperfusion in Sirt4 ^{-/-} und Sirt4 ^{+/+}	55
Abbildung 19: Kardiale kontraktile Funktion in der Langendorff-Perfusion in cSirt4TG und cSirt4TG Kontroll-Mäusen.	57
Abbildung 20: Kardiale Infarktgröße nach 60-minütiger LAD-Ligatur, bestimmt durch Evans-Blue-TTC-Staining in cSirt4TG und cSirt4TG Kontroll-Mäusen...	58
Abbildung 21: Die Erholung der kontraktile Funktion nach 25 Minuten Ischämie und 40 Minuten Reperfusion in cSirt4TG und cSirt4TG Kontroll-Herzen	60

IX. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Laborgeräte	17
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	20
Tabelle 3: Chemikalien	22
Tabelle 4: Sequenzen der Primer für die PCR (Genotyping).....	23
Tabelle 5: Zusammensetzung des Lysepuffers	25
Tabelle 6: Zusammensetzung PCR-Reagenzien Sirt4 ^{-/-} und Sirt4 ^{+/+}	26
Tabelle 7: Zusammensetzung PCR-Reagenzien cSirt4 transgen.....	27
Tabelle 8: Zusammensetzung PCR Reagenzien cSirt4TG Wildtyp	28
Tabelle 9: Zusammensetzung PCR-Reagenzien α -MHC-cre Gen.....	28
Tabelle 10: Zusammensetzung für 20 Proben (50mg Gewebe).....	29
Tabelle 11: Homogenisationspuffer	30
Tabelle 12: Laemmli-Puffer	31
Tabelle 13: Sammelgel.....	31
Tabelle 14: Trenngel	31
Tabelle 15: SDS-PAGE Laufpuffer	31
Tabelle 16: Transferpuffer	32
Tabelle 17: STE1 Puffer.....	33
Tabelle 18: STE2 Puffer.....	33
Tabelle 19: Respirationspuffer	35
Tabelle 20: Krebs-Henseleit-Puffer	41
Tabelle 21: mPTP-Puffer	44
Tabelle 22: Basispuffer	45
Tabelle 23: Substratpuffer.....	45

Tabelle 24: Herzgewicht, Körpergewicht, Tibialänge, Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis und Herzgewicht-Tibialängen-Verhältnis in Sirt4 ^{-/-} und Sirt4 ^{+/+} Mäusen im Alter von 8 Wochen.....	48
Tabelle 25: Herzgewicht, Körpergewicht, Tibialänge, Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis und Herzgewicht-Tibialängen-Verhältnis in cSirt4TG und cSirt4TG Kontroll-Mäusen im Alter von 8 Wochen.....	56

X. LITERATURVERZEICHNIS

- Ahuja, Nidhi; Schwer, Bjoern; Carobbio, Stefania; Waltregny, David; North, Brian J.; Castronovo, Vincenzo et al. (2007): Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (46), S. 33583–33592. DOI: 10.1074/jbc.M705488200.
- Alam, Muhammad Rizwan; Baetz, Delphine; Ovize, Michel (2015): Cyclophilin D and myocardial ischemia-reperfusion injury: a fresh perspective. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 78, S. 80–89. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.09.026.
- Argaud, Laurent; Gateau-Roesch, Odile; Muntean, Danina; Chalabreysse, Lara; Loufouat, Joseph; Robert, Dominique; Ovize, Michel (2005): Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 38 (2), S. 367–374. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2004.12.001.
- Baines, Christopher P.; Kaiser, Robert A.; Purcell, Nicole H.; Blair, N. Scott; Osinska, Hanna; Hambleton, Michael A. et al. (2005): Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. In: *Nature* 434 (7033), S. 658–662. DOI: 10.1038/nature03434.
- Bauer, Christian; Klinke, Rainer; Silbernagl, Stefan (2001): *Lehrbuch der Physiologie*. 55 Tabellen. 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Baxter, G. F.; Mocanu, M. M.; Brar, B. K.; Latchman, D. S.; Yellon, D. M. (2001): Cardioprotective effects of transforming growth factor-beta1 during early reoxygenation or reperfusion are mediated by p42/p44 MAPK. In: *Journal of cardiovascular pharmacology* 38 (6), S. 930–939.
- Berger, Joel; Moller, David E. (2002): The mechanisms of action of PPARs. In: *Annual review of medicine* 53, S. 409–435. DOI: 10.1146/annurev.med.53.082901.104018.
- Bernardi, Paolo; Krauskopf, Alexandra; Basso, Emy; Petronilli, Valeria; Blachly-Dyson, Elizabeth; Blachly-Dyson, Elizabeth et al. (2006): The mitochondrial

- permeability transition from in vitro artifact to disease target. In: *The FEBS journal* 273 (10), S. 2077–2099. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05213.x.
- Boylston, Jennifer A.; Sun, Junhui; Chen, Yong; Gucek, Marjan; Sack, Michael N.; Murphy, Elizabeth (2015): Characterization of the cardiac succinylome and its role in ischemia-reperfusion injury. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 88, S. 73–81. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.09.005.
- Brown, David A.; Hale, Sharon L.; Baines, Christopher P.; del Rio, Carlos L.; Hamlin, Robert L.; Yueyama, Yukie et al. (2014): Reduction of early reperfusion injury with the mitochondria-targeting peptide bendavia. In: *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 19 (1), S. 121–132. DOI: 10.1177/1074248413508003.
- Brunet, Anne; Sweeney, Lora B.; Sturgill, J. Fitzhugh; Chua, Katrin F.; Greer, Paul L.; Lin, Yingxi et al. (2004): Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. In: *Science (New York, N.Y.)* 303 (5666), S. 2011–2015. DOI: 10.1126/science.1094637.
- Campbell, Fiona M.; Kozak, Ray; Wagner, Alese; Altarejos, Judith Y.; Dyck, Jason R. B.; Belke, Darrell D. et al. (2002): A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPARalpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (6), S. 4098–4103. DOI: 10.1074/jbc.M106054200.
- Chen, Danica; Guarente, Leonard (2007): SIR2: a potential target for calorie restriction mimetics. In: *Trends in molecular medicine* 13 (2), S. 64–71. DOI: 10.1016/j.molmed.2006.12.004.
- Chen, Min; Liu, Bingqian; Gao, Qianying; Zhuo, Yehong; Ge, Jian (2011): Mitochondria-targeted peptide MTP-131 alleviates mitochondrial dysfunction and oxidative damage in human trabecular meshwork cells. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 52 (10), S. 7027–7037. DOI: 10.1167/iovs.11-7524.
- Clark, L. C.; Wolf, R.; Granger, D.; Taylor, Z. (1953): Continuous recording of

blood oxygen tensions by polarography. In: *Journal of applied physiology* 6 (3), S. 189–193.

Cohen, Michael V.; Yang, Xi-Ming; Downey, James M. (2008): Acidosis, oxygen, and interference with mitochondrial permeability transition pore formation in the early minutes of reperfusion are critical to postconditioning's success. In: *Basic research in cardiology* 103 (5), S. 464–471. DOI: 10.1007/s00395-008-0737-9.

Corton, Julia M.; Gillespie, John G.; Hardie, D.Grahame (1994): Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. In: *Current Biology* 4 (4), S. 315–324. DOI: 10.1016/S0960-9822(00)00070-1.

Crompton, M.; Virji, S.; Doyle, V.; Johnson, N.; Ward, J. M. (1999): The mitochondrial permeability transition pore. In: *Biochemical Society symposium* 66, S. 167–179.

Cross, T. G.; Scheel-Toellner, D.; Henriquez, N. V.; Deacon, E.; Salmon, M.; Lord, J. M. (2000): Serine/threonine protein kinases and apoptosis. In: *Experimental cell research* 256 (1), S. 34–41. DOI: 10.1006/excr.2000.4836.

Csibi, Alfred; Fendt, Sarah-Maria; Li, Chenggang; Poulogiannis, George; Choo, Andrew Y.; Chapski, Douglas J. et al. (2013): The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. In: *Cell* 153 (4), S. 840–854. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.023.

Dare, Anna J.; Logan, Angela; Prime, Tracy A.; Rogatti, Sebastian; Goddard, Martin; Bolton, Eleanor M. et al. (2015): The mitochondria-targeted anti-oxidant MitoQ decreases ischemia-reperfusion injury in a murine syngeneic heart transplant model. In: *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 34 (11), S. 1471–1480. DOI: 10.1016/j.healun.2015.05.007.

Dawn, Buddhadeb; Xuan, Yu-Ting; Guo, Yiru; Rezazadeh, Arash; Stein, Adam B.; Hunt, Greg et al. (2004): IL-6 plays an obligatory role in late preconditioning via JAK-STAT signaling and upregulation of iNOS and COX-2. In: *Cardiovascular Research* 64 (1), S. 61–71. DOI: 10.1016/j.cardiores.2004.05.011.

Denu, John M. (2005): The Sir 2 family of protein deacetylases. In: *Current opinion in chemical biology* 9 (5), S. 431–440. DOI: 10.1016/j.cbpa.2005.08.010.

Di Lisa, F.; Menabò, R.; Canton, M.; Barile, M.; Bernardi, P. (2001): Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (4), S. 2571–2575. DOI: 10.1074/jbc.M006825200.

Di Lisa, Fabio; Canton, Marcella; Carpi, Andrea; Kaludercic, Nina; Menabò, Roberta; Menazza, Sara; Semenzato, Martina (2011): Mitochondrial injury and protection in ischemic pre- and postconditioning. In: *Antioxidants & redox signaling* 14 (5), S. 881–891. DOI: 10.1089/ars.2010.3375.

Dryden, S. C.; Nahhas, F. A.; Nowak, J. E.; Goustin, A.-S.; Tainsky, M. A. (2003): Role for Human SIRT2 NAD-Dependent Deacetylase Activity in Control of Mitotic Exit in the Cell Cycle. In: *Molecular and Cellular Biology* 23 (9), S. 3173–3185. DOI: 10.1128/MCB.23.9.3173-3185.2003.

Ford, Ethan; Voit, Renate; Liszt, Gregory; Magin, Cornelia; Grummt, Ingrid; Guarente, Leonard (2006): Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. In: *Genes & development* 20 (9), S. 1075–1080. DOI: 10.1101/gad.1399706.

Frye, R. A. (1999): Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. In: *Biochemical and biophysical research communications* 260 (1), S. 273–279. DOI: 10.1006/bbrc.1999.0897.

Frye, R. A. (2000): Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. In: *Biochemical and biophysical research communications* 273 (2), S. 793–798. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3000.

Gibson, C. Michael; Giugliano, Robert P.; Kloner, Robert A.; Bode, Christoph; Tendera, Michal; Janosi, Andras et al. (2016): EMBRACE STEMI study: a Phase 2a trial to evaluate the safety, tolerability, and efficacy of intravenous MTP-131 on reperfusion injury in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention. In: *European heart journal* 37 (16), S. 1296–1303. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv597.

Gilde, Andries J.; van der Lee, Karin A J M; Willemsen, Peter H. M.; Chinetti, Giulia; van der Leij, Feike R; van der Vusse, Ger J et al. (2003): Peroxisome

- proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. In: *Circulation research* 92 (5), S. 518–524. DOI: 10.1161/01.RES.0000060700.55247.7C.
- Granger, D. N. (1988): Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. In: *The American journal of physiology* 255 (6 Pt 2), S. 75.
- Granger, D. N.; Benoit, J. N.; Suzuki, M.; Grisham, M. B. (1989): Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. In: *The American journal of physiology* 257 (5 Pt 1), S. 8.
- Griffiths, E. J.; Halestrap, A. P. (1995): Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. In: *The Biochemical journal* 307 (Pt 1), S. 93–98.
- Haigis, Marcia C.; Guarente, Leonard P. (2006): Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. In: *Genes & development* 20 (21), S. 2913–2921. DOI: 10.1101/gad.1467506.
- Haigis, Marcia C.; Mostoslavsky, Raul; Haigis, Kevin M.; Fahie, Kamau; Christodoulou, Danos C.; Murphy, Andrew J. et al. (2006): SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. In: *Cell* 126 (5), S. 941–954. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.057.
- Hake, S. B.; Xiao, A.; Allis, C. D. (2004): Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. In: *British journal of cancer* 90 (4), S. 761–769. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601575.
- Halestrap, A. P. (1999): The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. In: *Biochemical Society symposium* 66, S. 181–203.
- Halestrap, A. P. (2006): Calcium, mitochondria and reperfusion injury. A pore way to die. In: *Biochim. Soc. Trans.* 34 (2), S. 232–237. DOI: 10.1042/BST0340232.
- Halestrap, Andrew P.; Clarke, Samantha J.; Javadov, Sabzali A. (2004): Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. In: *Cardiovascular Research* 61 (3), S.

372–385. DOI: 10.1016/S0008-6363(03)00533-9.

Hausenloy, D. (2003): Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia–reperfusion injury. In: *Cardiovascular Research* 60 (3), S. 617–625. DOI: 10.1016/j.cardiores.2003.09.025.

Hausenloy, Derek J.; Duchon, Michael R.; Yellon, Derek M. (2003): Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. In: *Cardiovascular Research* 60 (3), S. 617–625.

Hausenloy, Derek J.; Yellon, Derek M. (2004): New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. In: *Cardiovascular Research* 61 (3), S. 448–460. DOI: 10.1016/j.cardiores.2003.09.024.

Hausenloy, Derek J.; Yellon, Derek M. (2013): Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. In: *The Journal of clinical investigation* 123 (1), S. 92–100. DOI: 10.1172/JCI62874.

Heusch, Gerd; Boengler, Kerstin; Schulz, Rainer (2010): Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection. In: *Basic research in cardiology* 105 (2), S. 151–154. DOI: 10.1007/s00395-009-0080-9.

Hou, Yanjuan; Li, Shuangcheng; Wu, Ming; Wei, Jinying; Ren, Yunzhuo; Du, Chunyang et al. (2016): Mitochondria-targeted peptide SS-31 attenuates renal injury via an antioxidant effect in diabetic nephropathy. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 310 (6), F547-59. DOI: 10.1152/ajprenal.00574.2014.

Huang, Jing-Yi; Hirschey, Matthew D.; Shimazu, Tadahiro; Ho, Linh; Verdin, Eric (2010): Mitochondrial sirtuins. In: *Biochimica et biophysica acta* 1804 (8), S. 1645–1651. DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.12.021.

Huss, Janice M.; Kelly, Daniel P. (2004): Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. In: *Circulation research* 95 (6), S. 568–578. DOI: 10.1161/01.RES.0000141774.29937.e3.

Javadov, Sabzali A.; Clarke, Samantha; Das, Manika; Griffiths, Elinor J.; Lim, Kelvin H. H.; Halestrap, Andrew P. (2003): Ischaemic preconditioning inhibits

opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. In: *The Journal of physiology* 549 (Pt 2), S. 513–524. DOI: 10.1113/jphysiol.2003.034231.

Jeong, Seung Min; Lee, Annie; Lee, Jaewon; Haigis, Marcia C. (2014): SIRT4 protein suppresses tumor formation in genetic models of Myc-induced B cell lymphoma. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (7), S. 4135–4144. DOI: 10.1074/jbc.M113.525949.

Kaeberlein, M.; McVey, M.; Guarente, L. (1999): The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. In: *Genes & development* 13 (19), S. 2570–2580.

Karamanlidis, Georgios; Lee, Chi Fung; Garcia-Menendez, Lorena; Kolwicz, Stephen C., JR; Suthammarak, Wichit; Gong, Guohua et al. (2013): Mitochondrial complex I deficiency increases protein acetylation and accelerates heart failure. In: *Cell metabolism* 18 (2), S. 239–250. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.07.002.

Katz, Arnold M. (2000): Heart failure. Pathophysiology, molecular biology and clinical management. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0834/99034752-d.html>.

Keeley, Ellen C.; Boura, Judith A.; Grines, Cindy L. (2003): Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. A quantitative review of 23 randomised trials. In: *The Lancet* 361 (9351), S. 13–20. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)12113-7.

Kerr, P. M.; Suleiman, M. S.; Halestrap, A. P. (1999): Reversal of permeability transition during recovery of hearts from ischemia and its enhancement by pyruvate. In: *The American journal of physiology* 276 (2 Pt 2), H496-502.

Kreutzig, Thomas (2001): Biochemie. Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog. 10., vollst. überarb. Aufl. München [u.a.]: Urban & Fischer (GK1).

Laurent, Gaëlle; German, Natalie J.; Saha, Asish K.; de Boer, Vincent C J; Davies, Michael; Koves, Timothy R. et al. (2013): SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA decarboxylase. In: *Molecular cell* 50 (5), S. 686–698. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.05.012.

Lecour, Sandrine (2009): Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 47 (1), S. 32–40. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.03.019.

Lecour, Sandrine; Smith, Robert M.; Woodward, Brian; Opie, Lionel H.; Rochette, Luc; Sack, Michael N. (2002): Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF alpha and ischemic preconditioning mediated cardioprotection. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 34 (5), S. 509–518. DOI: 10.1006/jmcc.2002.1533.

Lehman, J. J.; Barger, P. M.; Kovacs, A.; Saffitz, J. E.; Medeiros, D. M.; Kelly, D. P. (2000): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. In: *The Journal of clinical investigation* 106 (7), S. 847–856. DOI: 10.1172/JCI10268.

Leiser, Scott F.; Kaeberlein, Matt (2010): A role for SIRT1 in the hypoxic response. In: *Molecular cell* 38 (6), S. 779–780. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.06.015.

Lemasters, J. J.; Bond, J. M.; Chacon, E.; Harper, I. S.; Kaplan, S. H.; Ohata, H. et al. (1996): The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. In: *EXS* 76, S. 99–114.

Lomb, David J.; Laurent, Gaëlle; Haigis, Marcia C. (2010): Sirtuins regulate key aspects of lipid metabolism. In: *Biochimica et biophysica acta* 1804 (8), S. 1652–1657. DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.11.021.

Lombard, David B.; Alt, Frederick W.; Cheng, Hwei-Ling; Bunkenborg, Jakob; Streeper, Ryan S.; Mostoslavsky, Raul et al. (2007): Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. In: *Molecular and Cellular Biology* 27 (24), S. 8807–8814. DOI: 10.1128/MCB.01636-07.

Luo, Yu-Xuan; Tang, Xiaoqiang; An, Xi-Zhou; Xie, Xue-Min; Chen, Xiao-Feng; Zhao, Xiang et al. (2016): Sirt4 accelerates Ang II-induced pathological cardiac hypertrophy by inhibiting manganese superoxide dismutase activity. In: *European heart journal*. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw138.

Madamanchi, Nageswara R.; Runge, Marschall S. (2007): Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. In: *Circulation research* 100 (4), S. 460–473. DOI:

10.1161/01.RES.0000258450.44413.96.

Mathias, Rommel A.; Greco, Todd M.; Oberstein, Adam; Budayeva, Hanna G.; Chakrabarti, Rumela; Rowland, Elizabeth A. et al. (2014): Sirtuin 4 is a lipoamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. In: *Cell* 159 (7), S. 1615–1625. DOI: 10.1016/j.cell.2014.11.046.

Matsui, Yutaka; Takagi, Hiromitsu; Qu, Xueping; Abdellatif, Maha; Sakoda, Hideyuki; Asano, Tomoichiro et al. (2007): Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. In: *Circulation research* 100 (6), S. 914–922. DOI: 10.1161/01.RES.0000261924.76669.36.

McCord, Ronald A.; Michishita, Eriko; Hong, Tao; Berber, Elisabeth; Boxer, Lisa D.; Kusumoto, Rika et al. (2009): SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. In: *Aging* 1 (1), S. 109–121.

McKinsey, Timothy A.; Olson, Eric N. (2004): Cardiac histone acetylation--therapeutic opportunities abound. In: *Trends in genetics : TIG* 20 (4), S. 206–213. DOI: 10.1016/j.tig.2004.02.002.

Michan, Shaday; Sinclair, David (2007): Sirtuins in mammals: insights into their biological function. In: *The Biochemical journal* 404 (1), S. 1–13. DOI: 10.1042/BJ20070140.

Michishita, Eriko; McCord, Ronald A.; Berber, Elisabeth; Kioi, Mitomu; Padilla-Nash, Hesus; Damian, Mara et al. (2008): SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. In: *Nature* 452 (7186), S. 492–496. DOI: 10.1038/nature06736.

Michishita, Eriko; Park, Jean Y.; Burneskis, Jenna M.; Barrett, J. Carl; Horikawa, Izumi (2005): Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. In: *Molecular biology of the cell* 16 (10), S. 4623–4635. DOI: 10.1091/mbc.E05-01-0033.

Mostoslavsky, Raul; Chua, Katrin F.; Lombard, David B.; Pang, Wendy W.; Fischer, Miriam R.; Gellon, Lionel et al. (2006): Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. In: *Cell* 124 (2), S. 315–329. DOI: 10.1016/j.cell.2005.11.044.

Murphy, Elizabeth; Steenbergen, Charles (2008): Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. In: *Physiological reviews* 88 (2), S. 581–609. DOI: 10.1152/physrev.00024.2007.

Murphy, Michael P. (2008): Targeting lipophilic cations to mitochondria. In: *Biochimica et biophysica acta* 1777 (7-8), S. 1028–1031. DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.03.029.

Nakagawa, Takashi; Lomb, David J.; Haigis, Marcia C.; Guarente, Leonard (2009): SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. In: *Cell* 137 (3), S. 560–570. DOI: 10.1016/j.cell.2009.02.026.

Pan, Patricia W.; Feldman, Jessica L.; Devries, Mark K.; Dong, Aiping; Edwards, Aled M.; Denu, John M. (2011): Structure and biochemical functions of SIRT6. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (16), S. 14575–14587. DOI: 10.1074/jbc.M111.218990.

Park, Jeongsoon; Chen, Yue; Tishkoff, Daniel X.; Peng, Chao; Tan, Minjia; Dai, Lunzhai et al. (2013): SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways. In: *Molecular cell* 50 (6), S. 919–930. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.06.001.

Piper, H. (1998): A fresh look at reperfusion injury. In: *Cardiovascular Research* 38 (2), S. 291–300. DOI: 10.1016/S0008-6363(98)00033-9.

Piper, H. M.; Siegmund, B.; Ladilov YuV; Schlüter, K. D. (1993): Calcium and sodium control in hypoxic-reoxygenated cardiomyocytes. In: *Basic research in cardiology* 88 (5), S. 471–482.

Porter, George A.; Urciuoli, William R.; Brookes, Paul S.; Nadtochiy, Sergiy M. (2014): SIRT3 deficiency exacerbates ischemia-reperfusion injury: implication for aged hearts. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 306 (12), H1602-9. DOI: 10.1152/ajpheart.00027.2014.

Powers, Scott K.; Murlasits, Zsolt; Wu, Min; Kavazis, Andreas N. (2007): Ischemia-reperfusion-induced cardiac injury: a brief review. In: *Medicine and science in sports and exercise* 39 (9), S. 1529–1536. DOI: 10.1249/mss.0b013e3180d099c1.

Rauh, David; Fischer, Frank; Gertz, Melanie; Lakshminarasimhan, Mahadevan; Bergbrede, Tim; Aladini, Firouzeh et al. (2013): An acetylome peptide microarray

reveals specificities and deacetylation substrates for all human sirtuin isoforms.

In: *Nature communications* 4, S. 2327. DOI: 10.1038/ncomms3327.

Rosca, Mariana G.; Tandler, Bernard; Hoppel, Charles L. (2013): Mitochondria in cardiac hypertrophy and heart failure. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 55, S. 31–41. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2012.09.002.

Schmidt, Robert F.; Lang, Florian; Heckmann, Manfred (2011): *Physiologie des Menschen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Schwer, Bjoern; Schumacher, Bjoern; Lombard, David B.; Xiao, Cuiying; Kurtev, Martin V.; Gao, Jun et al. (2010): Neural sirtuin 6 (Sirt6) ablation attenuates somatic growth and causes obesity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (50), S. 21790–21794. DOI: 10.1073/pnas.1016306107.

Schwer, Bjoern; Verdin, Eric (2008): Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins. In: *Cell metabolism* 7 (2), S. 104–112. DOI: 10.1016/j.cmet.2007.11.006.

Shoba, Balaji; Lwin, Zin Mar; Lo Ling, Soo; Bay, Boon-Huat; Yip, George W.; Kumar, Srinivasan Dinesh (2009): Function of sirtuins in biological tissues. In: *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)* 292 (4), S. 536–543. DOI: 10.1002/ar.20875.

Sioufi, Antoine; Colussi, Daniele; Mangoni, Patrick (1983): Determination of oxyphenbutazone in human plasma by high-performance liquid chromatography. In: *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 275, S. 201–205. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)84362-5.

Skyschally, Andreas; Schulz, Rainer; Heusch, Gerd (2010): Cyclosporine A at reperfusion reduces infarct size in pigs. In: *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 24 (1), S. 85–87. DOI: 10.1007/s10557-010-6219-y.

Sloan, Ruben C.; Moukdar, Fatiha; Frasier, Chad R.; Patel, Hetal D.; Bostian, Phillip A.; Lust, Robert M.; Brown, David A. (2012): Mitochondrial permeability transition in the diabetic heart: contributions of thiol redox state and mitochondrial calcium to augmented reperfusion injury. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 52 (5), S. 1009–1018. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2012.02.009.

Smith, Robert M.; Suleman, Naushaad; Lacerda, Lydia; Opie, Lionel H.; Akira,

- Shizuo; Chien, Kenneth R.; Sack, Michael N. (2004): Genetic depletion of cardiac myocyte STAT-3 abolishes classical preconditioning. In: *Cardiovascular Research* 63 (4), S. 611–616. DOI: 10.1016/j.cardiores.2004.06.019.
- Stanley, William C.; Recchia, Fabio A.; Lopaschuk, Gary D. (2005): Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. In: *Physiological reviews* 85 (3), S. 1093–1129. DOI: 10.1152/physrev.00006.2004.
- Szabó, Ildikó; Pinto, Vito De; Zoratti, Mario (1993): The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. In: *FEBS Letters* 330 (2), S. 206–210. DOI: 10.1016/0014-5793(93)80274-X.
- Ulakcsai, Zsófia; Bagaméry, Fruzsina; Vincze, István; Szökő, Éva; Tábi, Tamás (2015): Protective effect of resveratrol against caspase 3 activation in primary mouse fibroblasts. In: *Croat Med J* 56 (2), S. 78–84. DOI: 10.3325/cmj.2015.56.78.
- Vega, R. B.; Huss, J. M.; Kelly, D. P. (2000): The Coactivator PGC-1 Cooperates with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha in Transcriptional Control of Nuclear Genes Encoding Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Enzymes. In: *Molecular and Cellular Biology* 20 (5), S. 1868–1876. DOI: 10.1128/MCB.20.5.1868-1876.2000.
- Verdin, Eric; Hirschey, Matthew D.; Finley, Lydia W. S.; Haigis, Marcia C. (2010): Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. In: *Trends in biochemical sciences* 35 (12), S. 669–675. DOI: 10.1016/j.tibs.2010.07.003.
- Verma, Manish; Shulga, Nataly; Pastorino, John G. (2013): Sirtuin-4 modulates sensitivity to induction of the mitochondrial permeability transition pore. In: *Biochimica et biophysica acta* 1827 (1), S. 38–49. DOI: 10.1016/j.bbabo.2012.09.016.
- Wong, Aaron K. F.; Howie, Jacqueline; Petrie, John R.; Lang, Chim C. (2009): AMP-activated protein kinase pathway: a potential therapeutic target in cardiometabolic disease. In: *Clinical science (London, England : 1979)* 116 (8), S. 607–620. DOI: 10.1042/CS20080066.
- Woodfield, K.; Rück, A.; Brdiczka, D.; Halestrap, A. P. (1998): Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine

- nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. In: *The Biochemical journal* 336 (Pt 2), S. 287–290.
- Yellon, D. M.; Baxter, G. F. (1999): Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury? In: *Trends in cardiovascular medicine* 9 (8), S. 245–249.
- Yellon, Derek M.; Hausenloy, Derek J. (2007): Myocardial reperfusion injury. In: *The New England journal of medicine* 357 (11), S. 1121–1135. DOI: 10.1056/NEJMra071667.
- Yi, Jingjie; Luo, Jianyuan (2010): SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. In: *Biochimica et biophysica acta* 1804 (8), S. 1684–1689. DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.05.002.
- Young, L. H.; Russell, R. R.; Yin, R.; Caplan, M. J.; Ren, J.; Bergeron, R. et al. (1999): Regulation of myocardial glucose uptake and transport during ischemia and energetic stress. In: *The American journal of cardiology* 83 (12A), S. 25.
- Yu, Jiujiu; Auwerx, Johan (2009): The role of sirtuins in the control of metabolic homeostasis. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1173 Suppl 1, S. 9. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.04952.x.
- Yu, Jiujiu; Auwerx, Johan (2010): Protein deacetylation by SIRT1: an emerging key post-translational modification in metabolic regulation. In: *Pharmacological research* 62 (1), S. 35–41. DOI: 10.1016/j.phrs.2009.12.006.
- Zhang, Chunyan; Li, Qingping; Kang, Lan; Lei, Xiaoping; Zhai, Xuesong; Zhao, Shuai et al. (2015): [Resveratrol inhibits hyperoxia-induced cell apoptosis through up-regulating SIRT1 expression in HPAECs]. In: *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology* 31 (5), S. 590–595.
- Zhang, Junmei; Sprung, Robert; Pei, Jimin; Tan, Xiaohong; Kim, Sungchan; Zhu, Heng et al. (2009): Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli*. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 8 (2), S. 215–225. DOI: 10.1074/mcp.M800187-MCP200.
- Zorov, D. B. (2000): Reactive Oxygen Species (ROS)-induced ROS Release. A New Phenomenon Accompanying Induction of the Mitochondrial Permeability Transition in Cardiac Myocytes. In: *Journal of Experimental Medicine* 192 (7), S. 1001–1014. DOI: 10.1084/jem.192.7.1001.

- Zorov, Dmitry B.; Juhaszova, Magdalena; Yaniv, Yael; Nuss, H. Bradley; Wang, Su; Sollott, Steven J. (2009): Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. In: *Cardiovascular Research* 83 (2), S. 213–225. DOI: 10.1093/cvr/cvp151.
- Zweier, J. L.; Fertmann, J.; Wei, G. (2001): Nitric oxide and peroxynitrite in postischemic myocardium. In: *Antioxidants & redox signaling* 3 (1), S. 11–22. DOI: 10.1089/152308601750100443.
- Zweier, J. L.; Flaherty, J. T.; Weisfeldt, M. L. (1987a): Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (5), S. 1404–1407.
- Zweier, J. L.; Rayburn, B. K.; Flaherty, J. T.; Weisfeldt, M. L. (1987b): Recombinant superoxide dismutase reduces oxygen free radical concentrations in reperfused myocardium. In: *The Journal of clinical investigation* 80 (6), S. 1728–1734. DOI: 10.1172/JCI113264.
- Zweier, Jay L.; Talukder, M. A. Hassan (2006): The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. In: *Cardiovascular Research* 70 (2), S. 181–190. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.02.025.

XI. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Wess für seine Bereitschaft bedanken mich als externe Doktorandin zu betreuen und mir so eine Promotion an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München zu ermöglichen. Ich bedanke mich für seine Hilfestellungen und die Zeit, die er sich für die Korrektur meiner Arbeit genommen hat.

Ich danke außerdem meinem Mentor und Betreuer Herrn Priv.-Doz. Dr. Heiko Bugger für das interessante Thema, die sehr gute Betreuung, sowie die Zeit, die er in die Überarbeitung dieser Dissertation investiert hat.

Bedanken möchte ich mich auch beim gesamten Laborteam, im Besonderen bei Dr. Cecilia Cimolai, Katharina Pfeil und Dr. Christoph Koentges, für ihre Unterstützung und Hilfestellung.

Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus der FAZIT-Stiftung, die mich finanziell gefördert hat.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern ganz herzlich für ihre lebenslange Unterstützung bedanken. Sie haben mir mein Studium sowie meine Doktorarbeit ermöglicht und mich in all meinen Entscheidungen unterstützt. Sie waren immer für mich da und haben stets ein offenes Ohr für meine Sorgen. Danke, dass ihr immer an mich glaubt. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen.

Danke auch an meine Schwester Silke für ihre Korrekturen, Ratschläge, und dass ich immer auf dich zählen kann.

Danke an meinen Mann Sebastian für das Aushalten meiner Launen während mancher Phasen der Doktorarbeit, für seine aufbauenden Worte und viele Denkanstöße. Danke, dass du immer für mich da bist.